

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

LA RÉACTIVATION MULTIPLE HOMOLOGUE ET HÉTÉROLOGUE DU BACTÉRIOPHAGE INACTIVÉ PAR VOIE PHYSIQUE ET CHIMIQUE

par W. MUTSAARS (*).

*(Laboratoire de Bactériologie,
Faculté de Médecine et de Pharmacie,
Université Libre de Bruxelles)*

Le phénomène de réactivation multiple a été découvert par Luria [1] et étudié par cet auteur et Dulbecco [2]. Utilisant les bactériophages pairs de la série T bien connue, ils ont montré que, si une particule de bactériophage endommagée par les rayons ultra-violets et fixée sur un germe sensible était incapable de reproduction, il n'en était plus de même si deux ou plusieurs particules lésées se fixaient sur un germe. Pour expliquer ces faits, ces auteurs ont admis la résolution du bactériophage intracellulaire en unités discrètes. Un lot complet d'unités est nécessaire à la reproduction, mais ces unités ne doivent pas nécessairement provenir de la même particule de bactériophage. Une unité détruite d'une particule peut être remplacée par une unité identique provenant d'une autre particule lésée en un autre endroit. Des recherches ultérieures de Dulbecco ont cependant fait abandonner cette hypothèse séduisante [3].

Watson [4] a obtenu une réactivation multiple des bactério-

(*) Manuscrit reçu le 13 août 1956.

phages T pairs inactivés par les rayons X. Il a également observé une réactivation croisée entre les bactériophages inactivés par les rayons X et ceux traités par les rayons ultra-violetes.

Au cours de ce travail, nous avons cherché à mettre en évidence un phénomène de réactivation multiple au moyen de bactériophage inactivé par le formol (réactivation homologue), et d'autre part un phénomène de réactivation multiple en utilisant des mélanges de bactériophage formolé et de bactériophage irradié par les rayons ultra-violetes (réactivation hétérologue).

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

BACTÉRIOPHAGES. — Les bactériophages utilisés ont été, en ordre principal, le bactériophage ϕ N actif sur le coli W, et occasionnellement les bactériophages T2, T4 et T6 et le coli B correspondant. Les bactériophages sont obtenus par culture en flacons de Roux contenant 100 ml de bouillon BHI faible. Ce milieu n'est autre que du bouillon à base de cœur de bœuf et de cervelle de veau (Brain Heart Infusion Difco) dilué au 1/10 en eau physiologique. Le bactériophage se multiplie fort bien dans ce milieu qui est évidemment moins opaque aux rayons ultra-violetes que le bouillon BHI ordinaire non dilué. On introduit dans chaque flacon 1 goutte d'une dilution à 10^{-3} de bactériophage issu d'un lot précédent et 1 ml de culture du colibacille correspondant, culture en bouillon BHI âgée de 24 heures. Après séjour de neuf heures à l'étuve on filtre sur bougie Chamberland 5L3. Les filtrats provenant de trois flacons sont réunis, puis répartis en tubes que l'on scelle et que l'on conserve à la glacière, après un prélèvement pour titrage.

COLIBACILLE. — Il a été utilisé une culture jeune de coli W ou B, selon le cas. On ensemence avec 1 goutte de culture âgée de 24 heures un ballon contenant 60 ml de milieu BHI. La culture est, après séjour de cinq heures à l'étuve à 37° , utilisée telle quelle ou diluée à 10^{-2} en bouillon BHI faible.

FORMOLISATION DU BACTÉRIOPHAGE. — A partir d'une solution commerciale de formol (Merck) à 40 volumes p. 100 de formol, on établit une dilution à 10^{-3} en bouillon BHI faible. De cette dilution on ajoute 0,5 ml à 4,5 ml de bactériophage ϕ N non dilué. Le tube est scellé et immergé dans un bain-marie à 37° où il séjourne à l'obscurité pendant vingt-six heures. La dilution à 10^{-3} du formol est préparée extemporanément. Les bactériophages de la série T ont été traités de même, mais la concen-

tration de formol est plus élevée : pour 4,5 ml de bactériophage on utilise 0,5 ml d'une dilution à $1,5 \cdot 10^{-3}$.

Il a été souvent établi simultanément un tube témoin constitué par 4,5 ml de bactériophage non dilué mélangé à 0,5 ml de milieu BHI faible. Ce tube est ensuite traité comme ceux contenant du bactériophage formolé.

IRRADIATION DU BACTÉRIOPHAGE. — Elle s'opère au moyen d'une lampe dite « Westinghouse Sterilamp germicidal type WL 15 ». L'intensité utilisée est de $28 \text{ ergs/mm}^{-2}/\text{sec}^{-1}$ (mesurée au photomètre de Latarjet). Une boîte de Petri ouverte d'un diamètre intérieur de 85 mm et à fond plat, contenant 5 ml de bactériophage ϕ N non dilué, est soumise au rayonnement pendant deux minutes, la couche mince de liquide étant constamment agitée. On irradie ainsi, selon les nécessités de l'expérience, plusieurs lots qui sont ensuite réunis, et qui constituent le ϕ N irradié non dilué, à partir duquel on obtient par dilution en bouillon BHI faible, le ϕ N irradié dilué à 10^{-1} . Le temps d'irradiation du bactériophage T2 a été de deux minutes trente secondes. Nous avons pour des raisons évidentes employé un bactériophage ϕ N fortement irradié. Néanmoins celui-ci présente le phénomène de réactivation multiple, comme les phages T pairs examinés par Luria. L'examen du tableau II révèle, par exemple, que le bactériophage irradié non dilué donne avec une quantité déterminée de colibacilles une moyenne de 260 plages, mais dilué à 10^{-1} on n'obtient plus qu'une moyenne de 1,2 plage par boîte de Petri. Une irradiation moins prolongée (soixante secondes) permet encore d'obtenir le phénomène de Luria, un tel bactériophage ϕ N donne à la dilution 10^{-1} une moyenne de 1 200 plages par boîte de Petri, mais à la dilution 10^{-2} on n'obtient plus que 20 plages.

TECHNIQUE DE NUMÉRATION DES BACTÉRIOPHAGES. — Nous avons utilisé la technique bien connue de la double couche de Gratia. La gélose de base est du bouillon BHI gélifié à 2 p. 100. La gélose de surface se distingue de la précédente par son taux plus faible de gélose : 0,6 p. 100. Les tubes qui contiennent environ 5 ml de cette gélose sont, après liquéfaction, maintenus dans un bain-marie à une température de 55° . Au moment de son utilisation, on incorpore à chaque tube 0,5 ml de culture non diluée de coli W ou B, selon le cas. A ce tube de gélose colibacillifère on ajoute le mélange expérimental de bactériophage et de colibacilles. Le tout est répandu sur la surface de la gélose de base, dans une boîte de Petri de 150 mm de diamètre. L'enrichissement de la gélose en germes, avant l'incorporation du mélange à titrer, permet d'obtenir un gazon microbien dense, condition nécessaire à une numération aisée des plages de bactériophagie. A défaut

de cette précaution, la numération de mélanges contenant du bactériophage irradié non dilué devient difficile par appauvrissement du gazon microbien, de nombreux germes étant tués par le phage irradié, sans qu'il y ait reproduction du virus, ainsi qu'il a été observé par Luria et Delbrück [5]. Cet enrichissement est également nécessaire lorsqu'il est fait usage de mélanges de bactériophage et de colibacille dilué à 10^{-2} . Ces colibacilles de renfort ne participent pas, bien entendu, à la réaction de fixation du bactériophage qui se déroule en milieu liquide.

FIXATION DU BACTÉRIOPHAGE. — Cette technique est la même pour les phages formolés ou irradiés.

Un volume de 5 ml de bactériophage est placé au bain-marie à 37° dans un tube à essai de grand diamètre. Après réchauffement, on y incorpore 5 ml de culture de coli correspondant (diluée ou non selon le cas). Après brassage énergique, on répartit des prélèvements de ce mélange dans 5 tubes à essai, à raison de 0,9 ml par tube. Ces tubes sont maintenus à 37° , ils sont retirés du bain-marie et titrés après six minutes, comptées à partir du mélange des germes au bactériophage.

Les mélanges qui donneraient un nombre trop élevé de plages sont dilués à 10^{-1} . Il s'agit principalement de mélanges contenant du bactériophage formolé dilué à 10^{-1} . On procède comme précédemment, en incorporant 5 ml de culture de coli à 5 ml de la dilution à 10^{-1} de phage formolé. Après séjour de six minutes au bain-marie, on fait un prélèvement de 0,9 ml que l'on ajoute à 8,1 ml de bouillon BHI faible, et les titrages se font à partir de cette dilution.

Les essais de réactivation hétérologue ont été menés de la même manière. On ajoute 5 ml de culture de colibacille à un tube contenant 2,5 ml de bactériophage formolé et 2,5 ml de bactériophage irradié. Ces mélanges sont également titrés après contact de six minutes à 37° . Au cours de certains essais, il a été fait usage de mélanges témoins constitués de 5 ml de culture de colibacille ajoutés à un tube contenant 2,5 ml de phage formolé ou irradié et 2,5 ml de bouillon BHI faible. Les numérations des plages de bactériophagie se font après incubation des boîtes de Petri pendant vingt-quatre heures à l'étuve à 37° .

RÉACTIVATION MULTIPLE HÉTÉROLOGUE (phage formolé-phage irradié).

EXPÉRIENCE I. — On prépare, en bouillon BHI faible, des dilutions à 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} de bactériophage ϕ N formolé. Des volumes de 2,5 ml de ces trois dilutions sont répartis respectivement dans trois tubes A, B et C. Chacun de ces trois tubes reçoit

2,5 ml de phage φ N irradié, non dilué. Après réchauffement au bain-marie à 37°, on incorpore à chacun de ces tubes 5 ml d'une culture jeune de coli W, non diluée. Chacun des tubes est titré en quintuple exemplaire.

Les tubes A1, B1 et C1 ne diffèrent des précédents que par l'utilisation de phage φ N irradié dilué à 10^{-1} , à la place du phage non dilué. Le tableau I donne les résultats de 5 expériences. Nous donnons au tableau II les résultats des titrages témoins. Ces titrages ont été faits, pour chaque expérience, simultanément avec les essais réunis au tableau précédent.

TABLEAU I. — Mélanges : 5 ml culture coli W non diluée ; 2,5 ml phage φ N irradié non dilué ; 2,5 ml phage φ N formolé dilué 10^{-1} , 10^{-2} ou 10^{-3} .

Prélèvements de 0,9 ml, en quintuple exemplaire, après six minutes de contact à 37°.

	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>
	Phage formolé dilué 10^{-1}	Phage formolé dilué 10^{-2}	Phage formolé dilué 10^{-3}
	Chiffres à x 20	Chiffres à x 2	Chiffres à x 2
Exp. 1	I480 (III.9)	2050 (I43.5)	I90 (25.6)
Exp. 2	I350 (96.8)	I910 (I09.8)	205 (I5.I)
Exp. 3	920 (48.I)	I220 (82.2)	II5 (I0.5)
Exp. 4	I780 (42.7)	2315 (I30.9)	285 (9)
Exp. 5	I445 (86.7)	I600 (I22.3)	I50 (I3.I)

Mélanges: 5 ml. culture Coli W non diluée.
2.5 ml. phage φ N irradié dilué 10^{-1} .
2.5 ml. phage φ N formolé dilué 10^{-1} , 10^{-2} ou 10^{-3} .

	<u>A I</u>	<u>B I</u>	<u>C I</u>
	Phage formolé dilué 10^{-1}	Phage formolé dilué 10^{-2}	Phage formolé dilué 10^{-3}
	Chiffres à x 20	Chiffres à x 2	Chiffres à x 2
Exp. 1	345 (25.7)	395 (I8.4)	37 (9.I)
Exp. 2	365 (22)	385 (25)	34 (7.8)
Exp. 3	255 (23.4)	270 (9.2)	27 (6.4)
Exp. 4	530 (40.3)	615 (20.5)	68 (6.7)
Exp. 5	325 (7.8)	295 (2I.9)	35 (6)

Dans chaque case les premiers chiffres représentent la moyenne arithmétique de la somme des plages de bactériophagie comptées sur 5 boîtes de Petri. Les chiffres entre parenthèses donnent la déviation moyenne. Ces remarques s'appliquent également aux tableaux II, IV, V, VI, VII.

TABLEAU II. — Mélanges : 5 ml culture coli W non diluée ;
5 ml phage φ N formolé dilué 10^{-1} , 10^{-2} ou 10^{-3} .
Prélèvements, après six minutes de contact à 37° , de 0,9 ml
en quintuple exemplaire.

	Phage formolé dilué 10^{-1} Chiffres à $\times 10$	Phage formolé dilué 10^{-2}	Phage formolé dilué 10^{-3}
Exp. 1	I90 (20.1)	I30 (13)	I6 (1.3)
Exp. 2	I50 (16.7)	85 (10.7)	6.4 (1.7)
Exp. 3	I35 (11.6)	82 (9.5)	5.2 (-)
Exp. 4	480 (44.4)	215 (11.6)	15 (3.9)
Exp. 5	240 (8.8)	100 (17.3)	8.6 (-)

Mélanges: 5 ml. culture Coli W non diluée.
5 ml. phage φ N irradié non dilué ou dilué 10^{-1}

	Phage irradié non dilué	Phage irradié dilué 10^{-1}
Exp. 1	260 (13.6)	I.2
Exp. 2	24 (5.2)	0.2
Exp. 3	28 (6.2)	0.4
Exp. 4	I35 (18.9)	6.6
Exp. 5	10	0.4

Les témoins sont constitués par :

1° Des titrages de bactériophage formolé seul. Celui-ci est dilué à 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} . On titre des mélanges de 5 ml de phage et de 5 ml de coli W non dilué.

2° Des titrages de phage irradié seul, non dilué et à la dilution de 10^{-1} . La technique est la même.

Il n'est peut-être pas inutile de faire remarquer qu'une comparaison valable entre les chiffres du tableau II et ceux du tableau I implique la multiplication de ces derniers par 2 ou par 20, comme il est d'ailleurs indiqué au tableau. En effet, les prélèvements de 0,9 ml des titrages du tableau I ont été pratiqués sur des mélanges initiaux de 25 p. 100 de bactériophage irradié, de 25 p. 100 de phage formolé et de 50 p. 100 de culture de coli W ; ceux du tableau II sont faits à partir de mélanges de 50 p. 100 de phage soit irradié, soit formolé et de 50 p. 100 de culture de coli W non diluée. Ces derniers prélèvements contiennent donc, par rapport à ceux du tableau I, un volume double de phage irradié ou formolé. Ceci étant dit, et en nous limitant aux résultats obtenus au moyen de mélanges de phage formolé

dilué 10^{-2} et de phage irradié non dilué, nous pouvons comparer les chiffres obtenus et les chiffres théoriques qu'une simple addition des résultats des titrages des phages formolés et irradiés isolés nous permet de calculer. Cette comparaison est résumée au tableau III.

TABLEAU III.

	Mélange phage formolé dilué 10^{-2} et phage irradié non dilué	Somme des 2 titrages des phages formolés et irradiés titrés isolément
Exp. I	4100	390
Exp. 2	3820	109
Exp. 3	2440	110
Exp. 4	4630	350
Exp. 5	3200	110

	Mélange phage formolé dilué 10^{-2} et phage irradié dilué 10^{-1} .	Somme des 2 titrages des phages formolés et irradiés titrés isolément.
Exp. I	395	131.2
Exp. 2	385	85.2
Exp. 3	270	82.4
Exp. 4	615	221.6
Exp. 5	295	100.4

Les mélanges de phage irradié non dilué et de phage formolé dilué à 10^{-2} , en présence d'un nombre constant de colibacilles, donnent de dix à trente-cinq fois plus de plages de bactériophagie que ce que l'addition des rendements en plages des phages irradiés et formolés isolés permet de supputer. Avec le phage irradié dilué à 10^{-1} , l'effet multiplicatif se réduit à 3, ce qui est encore remarquable, car on notera en se reportant au tableau II, qu'à cette dilution le phage irradié isolé ne donne parfois (expérience II) qu'une plage pour 5 boîtes de Petri, soit une particule active pour 4,5 ml de mélange phage et coli.

EXPÉRIENCE II. — L'effet observé ne se produit que si le colibacille se trouve en présence d'un mélange de bactériophage irradié et de phage formolé. Nous avons procédé comme suit. Ajoutons 2,5 ml de culture de coli W non diluée d'une part à un tube A1 contenant 2,5 ml de phage formolé dilué à 10^{-2} en bouillon BHI faible, et d'autre part à un tube A2 contenant 2,5 ml de phage irradié non dilué. Ces deux tubes sont maintenus à 37° et après contact de six minutes on mélange soigneusement

leurs contenus, et on opère en quintuple exemplaire des prélèvements de 0,9 ml aux fins de titrage. Un tube témoin est constitué d'un mélange de 2,5 ml de phage formolé dilué à 10^{-2} , de 2,5 ml de phage irradié non dilué et de 5 ml de culture de coli W non

TABLEAU IV.

	I	II
	<u>Tube A 1</u> : 2.5 ml. phage formolé dilué 10^{-2} + 2.5 ml. culture coli non diluée	2.5 ml. phage formolé dilué 10^{-2} + 2.5 ml. phage irradié non dilué + 5 ml. culture coli non diluée.
	<u>Tube A 2</u> : 2.5 ml. phage irradié non dilué + 2.5 ml. culture coli non diluée. Mélange de A 1 et A 2 après 6 minutes.	Contact 6 minutes
Exp. 6	170 (17.8)	2775 (200)
Exp. 7	230 (21.2)	1660 (153)
Exp. 8	390 (11)	1995 (168)
Exp. 9	90 (10.5)	945 (38.1)
Exp. 10	65 (9.9)	810 (20.5)

	III	IV	V
	2.5 ml. phage formolé dilué 10^{-2} + 2.5 ml. bouillon + 5 ml. culture	2.5 ml. phage irradié + 2.5 ml. bouillon + 5 ml. culture	Nombre de germes par ml. Chiffres à x par 10^6
Exp. 6	45 (12)	150 (30.9)	425 (12.5)
Exp. 7	80 (15.6)	15 (2.8)	220 (7)
Exp. 8	185 (19.7)	100 (6.1)	170 (13)
Exp. 9	20 (3)	4	370 (12.7)
Exp. 10	15 (5)	25 (2.7)	420 (15.9)

diluée. La composition de ce tube témoin est identique à celle des tubes de la série B (expérience I). Après contact de six minutes à 37° , les prélèvements de ce tube sont titrés.

Les deux séries de prélèvements ont même teneur en phage irradié et formolé et en germes, ils ne diffèrent que par le mode d'exposition des germes aux deux types de phage. Le tableau IV donne les résultats de cinq essais (expériences VI à X). Nous avons ajouté à ce tableau les résultats des titrages faits à partir

de mélanges de la composition suivante : 2,5 ml de phage formolé dilué 10^{-2} + 2,5 ml de bouillon faible + 5 ml de culture de coli W non diluée (résultats de la colonne III) et : 2,5 ml de phage irradié non dilué + 2,5 ml + 5 ml de bouillon faible + 5 ml de culture de coli W non diluée (résultats de la colonne IV). On trouvera également dans ce tableau les numérations des cultures de coli W utilisées (colonne V).

La somme des deux titrages des colonnes III et IV devrait théoriquement, pour chaque expérience, approcher des chiffres de la colonne I, qui sont cependant supérieurs en règle générale. Ceci est peut-être dû à la présence de phage libre formolé et irradié, au moment du mélange des deux tubes A1 et A2, phage qui pourrait alors se fixer sur un bacille déjà muni d'une particule inactive à elle seule. Les probabilités d'un tel processus doivent néanmoins être minimales par rapport à celles qu'a un colibacille de récolter deux ou plusieurs particules hétérogènes à partir d'un mélange de phage formolé et irradié (chiffres de la colonne II).

EXPÉRIENCE III. — Nous préparons une série de tubes contenant tous 2,5 ml de phage formolé dilué à 10^{-2} . Ajoutons au tube 1 2,5 ml de phage irradié non dilué, ensuite 5 ml de culture de coli W non diluée. Ce tube témoin est en tous points identique aux tubes de la série B (tableau I). Ce tube est titré après six minutes de contact à 37°. Le tube 2, mis au bain-marie, reçoit 5 ml de culture de coli W non diluée, et une minute plus tard, 2,5 ml de phage irradié. Le titrage se fait après six minutes de contact entre le phage formolé et les bacilles, qui n'ont été au contact du phage irradié que pendant cinq minutes. Le tube 3 ne diffère du tube 2 que par les temps de contact du phage irradié : trois minutes ; il en est de même pour le tube 4 : deux minutes, et le tube 5 : une minute. Nous constituons donc une série A de titrages provenant de tubes où la durée de contact entre le phage formolé et les bacilles est constante (six minutes), celle du phage irradié et des bacilles diminuant de six à une minute.

Nous préparons de même une série B inverse, le temps de contact entre le phage irradié et les bacilles étant constant (six minutes), celui du phage formolé et des bacilles diminuant de cinq à une minute. Les témoins usuels sont établis : a) titrage d'un mélange de 2,5 ml de phage formolé dilué à 10^{-2} + 2,5 ml de bouillon BHI faible + 5 ml de culture de coli W non diluée ; b) titrage d'un mélange de phage irradié + 2,5 ml de bouillon BHI faible + 5 ml de culture de coli W. Il a été procédé à la numération de la culture de coli W : nombre de germes dans 1 ml à multiplier par 10^6 .

Le tableau V donne les résultats d'une expérience.

Les deux séries A et B ne donnent pas de résultats identiques. L'incorporation de plus en plus tardive de phage irradié à un mélange de phage formolé et de colibacilles entraîne une chute de plus en plus forte du rendement en plages ; la série inverse présente, au contraire, après une augmentation, une stabilisation du nombre de plages.

TABLEAU V.

Série A		Série B	
Contact entre coli et		Contact entre coli et	
Phage formolé	Phage irradié	Phage irradié	Phage formolé
6 min.	6 min.	6 min.	6 min.
I8I5 (96.7)		-----	
6 min.	5 min.	6 min.	5 min.
I900 (97.8)		2080 (II9)	
6 min.	4 min.	6 min.	4 min.
I565 (71.2)		2620 (84.5)	
6 min.	3 min.	6 min.	3 min.
I2IO (93.5)		2680 (565)	
6 min.	2 min.	6 min.	2 min.
965 (71.7)		2670 (104)	
6 min.	I min.	6 min.	I min.
880 (71.4)		2670 (23.2)	

Phage irradié + bouillon : 7,4 ; Phage formolé + bouillon : 130 (2,3) ; Numération coli W : 560 (34,8) $\times 10^6$.

RÉACTIVATION MULTIPLE HOMOLOGUE (phage formolé).

EXPÉRIENCE IV. — Pour chaque essai, cette expérience a été menée simultanément avec celle relatée sous la rubrique expérience I (voir tableau II). Dans ce tableau, nous donnons les résultats de 5 essais, réalisés en mettant en contact un volume de culture de coli W non diluée et un volume de phage formolé dilué 10^{-1} , 10^{-2} ou 10^{-3} . On y remarque que la chute du nombre de plages ne correspond pas à celle qu'en théorie le passage d'une dilution 10^{-1} à une dilution 10^{-2} devrait nous donner : cette chute est en réalité plus importante. C'est ainsi que dans l'expérience I on obtient 1 900 plages avec la dilution 10^{-1} et 129 avec la dilution 10^{-2} , l'expérience II nous donne : 10^{-1} : 1 500 ; 10^{-2} : 85.

Le tableau VI donne les résultats d'essais menés conjointement à ceux figurant au tableau II ; ces essais sont donc comparables.

Ils ne diffèrent de ceux du tableau II que par l'utilisation d'une dilution à 10^{-2} , en bouillon BHI faible, en remplacement de la culture de coli W non diluée utilisée précédemment. De cette façon, nous n'avons modifié que le rapport : nombre de particules de phage formolé/nombre de germes, ce rapport étant en l'occurrence multiplié par 100.

TABLEAU VI. — **Mélanges : 5 ml culture coli W diluée 10^{-2} ; 5 ml phage φ N formolé dilué 10^{-1} , 10^{-2} ou 10^{-3} .**

	Phage formolé dilué 10^{-1} à $\times 10$.	Phage formolé dilué 10^{-2}	Phage formolé dilué 10^{-3}	Numération Coli. à $\times 10^6$
Exp. 1	I620 (I49)	I030 (97)	I40 (I0.5)	370 (I6.2)
Exp. 2	I370 (77)	I445 (276)	90 (8.4)	I50 (I4.7)
Exp. 3	I600 (409)	I360 (I83)	IIO (25)	260 (4.6)
Exp. 4	3I70 (455)	2700 (20I)	240 (22)	270 (9.3)
Exp. 5	2340 (634)	2095 (93)	I60 (27)	325 (9)

Nous donnons également, et ces chiffres sont valables pour les tableaux I et II, les numérations des cultures de coli W utilisées pour chaque essai. Ces chiffres indiquent le nombre de germes viables par millilitre et sont à multiplier par 10^6 (culture non diluée) ou par 10^4 (culture diluée).

La dilution à 10^{-2} du nombre de germes, mis en présence de phage formolé, a donc pour effet d'augmenter considérablement le nombre de plages. Il est évident qu'en diminuant le nombre de germes sans modifier le nombre de particules de phage formolé, on augmente les probabilités de fixation sur un seul germe de deux ou plusieurs particules. Il faut admettre que les particules formolées, fixées isolément sur les bacilles, sont incapables de reproduction, mais que la multiplication du bactériophage se poursuit si la cellule microbienne recueille les éléments issus de deux ou plusieurs particules formolées. Nous retrouvons donc ici pour le phage formolé un phénomène semblable à celui décrit par Luria pour le phage irradié par les rayons ultra-violets et par Watson pour le phage traité par les rayons X.

Les expériences numérotées de I à V, figurant aux tableaux I, II et VI (nous avons cru pouvoir démembrer ces essais en plusieurs tableaux pour la facilité de l'exposé), s'accompagnent de titrages du phage φ N non traité. Les tubes témoins en question consistent en un mélange de 4,5 ml de phage φ N normal et de 0,5 ml de bouillon BHI faible. Ce tube est scellé et séjourne au bain-marie à 37° pendant vingt-six heures, tout comme le tube de phage formolé. Il a été fait deux titrages de ce tube de φ N

normal, l'un en présence de culture de coli W non diluée, l'autre en présence de cette culture diluée à 10^{-2} (voir numération de ces cultures au tableau VI). Ces deux titrages ont été faits pour des dilutions 10^{-6} et 10^{-7} du phage normal. La technique est la même que précédemment : 5 ml de la dilution de phage en présence de 5 ml de la culture de coli W, le titrage se faisant après séjour de six minutes à 37° .

Le ϕ N normal possède un titre de $1,2 \cdot 10^9$ particules par millilitre, le nombre de germes étant de $1,5 \cdot 10^8$ (expérience II) pour la culture non diluée et par conséquent de $1,5 \cdot 10^6$ pour la culture diluée à 10^{-2} . Après six minutes de contact et à 37° , la fixation du phage ϕ N normal est presque complète (d'après une communication personnelle de Lahaye, elle est de 94,3 p. 100 après cinq minutes).

TABLEAU VII.

	Titrages ϕ N normal en présence de			
	Coli W non dilué		Coli W dilué 10^{-2}	
	Phage dilué		Phage dilué	
	<u>10^{-6}</u>	<u>10^{-7}</u>	<u>10^{-6}</u>	<u>10^{-7}</u>
Exp. 1	535 (25.7)	57 (5.7)	590 (16.8)	63 (9.7)
Exp. 2	585 (21.8)	55 (3.7)	670 (15.3)	61 (6.8)
Exp. 3	565 (14.8)	65 (8.2)	610 (26)	60 (7.1)
Exp. 4	565 (23.2)	60 (9)	610 (40.6)	65 (8.4)
Exp. 5	530 (17.8)	55 (10.4)	605 (46.5)	60 (8)

L'essai fait avec le phage formolé dilué à 10^{-2} , en présence de la culture diluée à 10^{-2} , met 8 particules environ, dont la majorité sont formolées, à la disposition de chaque germe. Si nous admettons que la fixation du phage formolé s'opère dans les mêmes conditions que celle du phage normal, cela implique, en appliquant la formule de Poisson, que 40 p. 100 des germes auront fixé 6 particules, 9 p. 100 en ayant fixé 5 et 14 p. 100 7. On ne trouvera que 0,2 p. 100 de germes ayant fixé une seule particule. Les conditions pour qu'il y ait réactivation multiple paraissent donc bien établies. Avec la culture non diluée et le phage formolé dilué 10^{-2} , on aurait 92 p. 100 de germes sans particule, et environ 7 p. 100 de germes avec une seule particule.

EXPÉRIENCE V. — Pour terminer nous mentionnerons des essais de réactivation hétérologue (phage formolé-phage irradié) au moyen des phages pairs de la série T. Trois tubes contiennent respectivement 5 ml de phage T2, T4 et T6, formolés et dilués à 10^{-2} en bouillon BHI faible. A chacun de ces tubes on ajoute

5 ml d'une culture jeune de coli B, culture dont on a d'autre part pratiqué une numération. Après six minutes de contact à 37°, on titre ces trois mélanges. Trois autres tubes contiennent également respectivement du phage formolé dilué 10^{-2} T2, T4 et T6, mais les volumes sont de 2,5 ml. A chacun de ces tubes on ajoute 2,5 ml de phage T2 irradié (deux minutes trente secondes avec l'intensité habituelle). Finalement chacun de ces tubes reçoit 5 ml de culture de coli B, les titrages se faisant comme précédemment (tableau VIII, expériences XI à XIII).

TABLEAU VIII.

	Exp. II	Exp. I2	Exp. I3
T2 formolé seul 10^{-2}	I300	I000	650
T4 formolé seul 10^{-2}	5800	5200	4100
T6 formolé seul 10^{-2}	I200	I700	450
T2 formolé + T2 irradié	2090x2	I600x2	I450x2
T4 formolé + T2 irradié	4070x2	4450x2	5050x2
T6 formolé + T2 irradié	II00x2	950x2	600x2
T2 irradié seul non dilué	60	I20	380
Coli B I ml. x 10^6	550	400	240

Titre phage T2 normal : $2,9 \times 10^9$ par millilitre ; T4 normal : 1×10^{10} par millilitre ; T6 normal : $7,8 \times 10^8$ par millilitre.

Pour chaque essai il est fait un titrage du phage T2 irradié non dilué. Les résultats des essais au moyen des mélanges de phages formolés et irradiés doivent être multipliés par 2, comme il a été exposé pour le phage ϕ N. Si nous examinons par exemple l'expérience XIII, nous constatons que le phage T2 formolé seul donne 650 plages, le T2 irradié seul 380 plages, mais le mélange des deux, compte tenu de la correction à faire, donne 2 900 plages au lieu des 1 030 qu'une simple addition permet de calculer. Le T4 isolé donne 4 150 plages, le T2 isolé 380, le mélange T4 formolé et T2 irradié 10 100. Toutes ces numérations, sauf celles du T2 seul irradié, ont été faites en diluant les mélanges germes-

phages à 10^{-1} , après contact de six minutes à 37° ; les chiffres réels des numérations ont donc été multipliés par 10.

Ces réactivations, tout en étant moins spectaculaires que celles obtenues au moyen du ϕ N, n'en sont pas moins importantes.

Le phage irradié T2 est capable, non seulement de réactiver du T2 formolé (ou vice versa), mais encore réactive-t-il du T4 et du T6 formolés.

Il serait intéressant de vérifier certains points :

1° Examiner les phages inactivés par des substances autres que le formol.

2° Examiner si les effets décrits se retrouvent chez d'autres virus.

CONCLUSIONS.

1° Les bactériophages ϕ N inactivés par le formol et par les rayons ultra-violets se réactivent mutuellement.

2° Il en est de même pour le phage T2, de plus le phage T2 inactivé par les rayons ultra-violets réactive les phages T4 et T6 inactivés par le formol.

3° Le phage ϕ N inactivé par le formol présente le phénomène de réactivation multiple.

SUMMARY.

HOMOLOGOUS AND HETEROLOGOUS MULTIPLE REACTIVATION OF THE BACTERIOPHAGE INACTIVATED BY PHYSICAL AND CHEMICAL AGENTS

1° There is a mutual reactivation between bacteriophages ϕ N inactivated by formaldehyde or by UV radiations.

2° The same reactivation is observed with phage T2. Furthermore phage T2, inactivated by UV radiation, reactivates phages T4 and T6 inactivated by formaldehyde.

3° With phage ϕ N inactivated by formaldehyde, the multiplicity reactivation is observed.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LURIA. *Proc. Nat. Acad. Med.*, 1947, **53**, 253.
- [2] DULBECCO. *Genetics*, 1949, **34**, 93.
- [3] DULBECCO. *J. Bact.*, 1952, **63**, 199.
- [4] WATSON. *J. Bact.*, 1950, **60**, 697.
- [5] LURIA et DELBRÜCK. *Arch. Bioch.*, 1942, **4**, 207.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU COMPLÉMENT

II. — PREMIERS STADES DE L'ACTION HÉMOLYTIQUE DU COMPLÉMENT. RÔLE PARTICULIER DU PREMIER COMPOSANT

par R. LAPORTE, L. HARDRE DE LOOZE et R. SILLARD (*)

(Institut Pasteur, Service de Sérologie)

Le développement du processus complexe qui aboutit à la lyse d'érythrocytes sensibilisés soumis à l'action du complément contenu dans un sérum frais a déjà été longuement étudié après que Ferrata eut découvert la possibilité de fractionner le complément, par dialyse ou dilution avec de l'eau distillée, en deux chaînons : moyen ou intermédiaire et terminal. L'hémolyse ne peut être obtenue que si l'on fait agir les deux chaînons simultanément, chacun d'eux pris isolément étant inactif. On s'aperçut vite que l'action du chaînon moyen doit précéder celle du chaînon terminal, d'où le qualificatif d'intermédiaire qui fut attribué au premier [1, 2]. Puis les recherches ultérieures firent admettre l'existence dans le sérum frais d'au moins quatre facteurs distincts intervenant obligatoirement dans le processus hémolytique (premier, deuxième, troisième et quatrième composants du complément) couramment désignés par les symboles : C'1, C'2, C'3, C'4 (C' représentant le complément entier). Les travaux de nombreux chercheurs parmi lesquels se placent en premier lieu Pillemer, Heidelberger, Levine, Mayer, Lepow et leurs collaborateurs [3, 4, 5, 6, 26] conduisent à considérer l'intervention des quatre composants comme non simultanée, l'ordre le plus probable d'action sur les globules étant le suivant : C'1, C'4, C'2 et enfin C'3 qui n'interviendrait qu'au dernier temps, entraînant alors l'apparition brusque de l'hémolyse.

Au cours de nos recherches antérieures, nous avons apporté des faits expérimentaux renforçant l'hypothèse que le premier composant est bien celui dont l'action marque le point de départ du processus hémolytique ; il a été vu en particulier que l'intervention nécessaire de Ca^{++} [7 à 11] au premier temps de ce processus paraît être localisée au niveau de C'1 qui ne peut se

(*) Manuscrit reçu le 13 juillet 1956.

fixer sur les globules sensibilisés que sous sa forme normale, assez instable, et constituée vraisemblablement par un complexe protéido-calciq[ue] [10]. La fixation préalable de C'1 conditionne la poursuite du processus hémolytique. Le but du présent travail est de reprendre l'étude des premiers stades d'action du complément, spécialement en ce qui concerne les liaisons fonctionnelles que C'1 peut contracter d'une part avec les érythrocytes sensibilisés par l'anticorps correspondant (EA : E = érythrocytes, A = anticorps) et d'autre part avec les autres composants. Le rôle primordial de Ca^{++} dans le mécanisme de ces liaisons nous a paru devoir être étudié plus avant.

Techniques. — Réactifs.

Nos recherches ont porté surtout sur le complément contenu dans le sérum frais de cobaye et accessoirement sur celui de porc, de rat blanc ou d'homme.

Les techniques utilisées ont été les mêmes que dans notre travail précédent [10], notamment en ce qui concerne la préparation des réactifs et la méthode quantitative de mesure de l'activité hémolytique. Toutefois, nous avons fait usage d'autres réactifs ainsi préparés :

a) COMPLÉMENT PRIVÉ DE C'4. — La technique de Pillemer par traitement à l'hydrazine, légèrement modifiée (neutralisation préalable de la solution d'hydrazine M 0,08 immédiatement avant de la mélanger avec le sérum suivant les proportions de 0,25 de la solution neutralisée d'hydrazine pour 1 cm³ de sérum), a été utilisée [12].

b) COMPLÉMENT PRIVÉ A LA FOIS DE C'3 ET DE C'4. — Du sérum frais de cobaye est traité d'abord par le zymosan suivant la technique de Pillemer [13, 14]. Nous utilisons, comme il a été dit [10], une préparation de zymosan conservée dans le vide, en ampoules scellées, à la glacière. Après une demi-heure de séjour au bain-marie du mélange sérum-zymosan en proportion convenable on ajoute la quantité appropriée de solution d'hydrazine neutralisée ; l'ensemble est maintenu encore une heure au bain-marie à 37° en agitant de temps à autre, puis le surnageant est séparé par centrifugation et conservé à la glacière. Les résultats sont identiques, que l'hydrazine ait été ajoutée après avoir séparé ou non le sérum du zymosan par une centrifugation intercalaire. Pour obtenir de bons réactifs il est souvent nécessaire de sélectionner les sérums à traiter. Pour être utilisable après élimination de C'3 et C'4, un complément de cobaye doit récupérer au moins 80 p. 100 de son activité hémolytique initiale par addition de sérum de cobaye inactivé par chauffage de vingt minutes à 56°.

c) CHAÎNONS SÉPARÉS PRIVÉS DE 1 OU DES 2 COMPOSANTS THERMOSTABLES (C'3 ET C'4). — On opère sur un complément traité au préalable par le zymosan ou par l'hydrazine ou par ces deux réactifs successivement. Pour séparer ensuite les deux chaînons (moyen et terminal), nous utilisons la méthode courante de préparation par dilution [15, 16, 17].

Le pourcentage de récupération de l'activité hémolytique du mélange des deux chaînons après addition de sérum inactivé s'abaisse en général autour de 75 p. 100. Notons que les deux chaînons préparés à partir d'un complément dépourvu de troisième et quatrième composants ne contiennent plus respectivement que le premier ou le deuxième composant. De même, on peut obtenir un sérum inactivé ne contenant que C'4 ou C'3 en chauffant à 56° un complément traité soit par le zymosan, soit par l'hydrazine.

d) PRÉPARATION DES GLOBULES SENSIBILISÉS AYANT FIXÉ LE PREMIER COMPOSANT : COMPLEXE EAC'1. — Une suspension de globules sensibilisés [10] est mélangée avec un égal volume d'une dilution fraîchement préparée soit de chaînon moyen ordinaire à 1/50, soit du même réactif ne contenant que C'1 et utilisé alors au titre de 1/32. Le mélange est effectué à la température de 1° ; les expériences relatées dans la suite prouvent que l'adsorption de C'1 par EA est très rapide même à basse température, en pratique néanmoins nous attendons dix minutes avant de centrifuger. On lave ensuite le culot globulaire une fois avec un volume égal d'eau physiologique à 1°. Après rejet de l'eau de lavage, les globules décantés sont remis en suspension dans une quantité suffisante d'eau salée tamponnée pour les ramener un peu au-dessus de la teneur initiale, puis, en procédant comme il a été dit par mesures photométriques [10], la richesse globulaire est rétablie exactement à son niveau d'origine. Certaines préparations de chaînon moyen contenant C'1 adsorbé imparfaitement à 1° il est parfois nécessaire de les sélectionner pour obtenir une bonne fixation sur les globules sensibilisés.

e) PRÉPARATION DE RÉACTIFS PURIFIÉS.

1° *Chaînon moyen purifié.* — Le chaînon moyen du complément de cobaye, préparé par la méthode de dilution, ne contient pas habituellement, après deux lavages du précipité, une proportion notable de C'2 et C'4 résiduels. Néanmoins, pour l'obtenir totalement débarrassé de ces deux composants, une meilleure technique consiste à effectuer deux précipitations successives, séparées par une redissolution du précipité dans de l'eau salée tamponnée (deux fois le volume initial du sérum). La deuxième précipitation est obtenue dans les conditions habituelles avec la solution M/200 de $P_2O_4H_2K$, mais en prenant un volume double de celui utilisé pour la première précipitation.

2° *Chaînon terminal purifié.* — Les préparations de chaînon terminal obtenues par dilution renferment toujours une proportion non négligeable de C'1. Pour l'éliminer, le procédé qui a donné les meilleurs résultats consiste en une dialyse à 1° pendant vingt-quatre heures en couche mince, contre une solution tamponnée de force ionique 0,02 et pH 5,4 [48, 47] après avoir élevé le taux de dilution du chaînon terminal à 1/25 avec cette même solution. Une nouvelle précipitation se produit et le surnageant décanté, neutralisé et rendu isotonique avec $ClNa$ n'hémolyse plus, même à dose élevée, les globules sensibilisés.

3° *Sérum et chaînon moyen inactivés à 56°.* — Ils contiennent aussi du C'1 résiduel. Pour les en débarrasser de façon pratiquement totale,

trois adsorptions par des globules sensibilisés non dilués sont nécessaires (0,5 de culot pour 2 cm³ de sérum inactivé à 1/2) : la première à la température du laboratoire et les deux autres à 37° pendant quinze minutes chacune.

Résultats des expériences.

1° OBTENTION DU COMPLEXE EAC'1. — Nous avons étudié en premier lieu les conditions dans lesquelles s'opère la combinaison de C'1 avec EA. L'action de C'1 sur EA donne naissance à un nouveau complexe remarquablement stable EAC'1 [2, 19, 10, 11]. Il est essentiel d'observer que la combinaison de C'1 avec EA s'opère aussi bien en absence qu'en présence de C'4, et que l'intervention de C'4, indispensable au développement ultérieur du processus lytique, peut sans doute se produire simultanément avec celle de C'1 lorsque les deux composants sont présents, mais ne s'exerce pas seule, en premier, sur les globules sensibilisés. Il paraît, aussi, bien établi que C'2, et en dernier

TABLEAU I.

(Toutes les doses sont exprimées en ml.)				Pourcentages d'hémolyse après 45mn à 37°. (2 tubes par essai)		
				Temps de contact préalable EA et CM		
				10mn	20mn	30mn
1°)	Les tubes sont laissés pendant :	Après ces temps les tubes sont centrifugés et le surnageant décanté dans d'autres tubes.	Culots remis en suspension dans eau tamponnée 2.- + SI 1/20 0,5 + CT hyd. 0,5	7I	74	77
EA. I.- CM hyd. 0,5 (12 tubes)	10mn	Les culots globulaires sont lavés avec 1,5 d'eau tamponnée et centrifugés.	Surnageant (I,5) + EA 1.- 10mn à 37°. + (CT hyd. SI). 0,5	7I,6	76	77
	ou 20mn			43,5	39	39
	ou 30mn			44	38,5	39
2°)	10mn à 37°.	Centrifuger après 15mn à 37°. Laver le culot une fois	Culot globulaire repris, dans eau tamponnée 2,5 + SI à 1/20 ... 0,5		4	
	Ajouter CT hyd 0,5				4	
3°)	10mn à 37°. Centrifuger	Culot lavé 1 fois repris dans eau tamponnée 2,5 + SI 1/20 0,5	Surnageant (I,5) + EA additionné de 1/40 de SI pur I		4	
					4	
					5I	
EA. I.- C' hyd. 0,5 (4 tubes)					5I	

C' hyd. = Complément privé de C'4 par l'hydrazine (contenant C'1, C'2, C'3).

CM hyd. et CT hyd. = Chainons moyen et terminal préparés à partir de C' hyd. (contenant : CM hyd. : C'1, C'3 ; CT hyd. : C'2, C'3).

Ces trois réactifs sont utilisés au taux de dilution de 1/32.

SI = Sérum de cobaye inactivé pendant trente minutes à 56° (contenant C'3, C'4).

Eau tamponnée = Eau salée à 0,85 p. 100 tamponnée + Mg++ et Ca++.

lieu C'3, ne peuvent se combiner avec les globules sensibilisés que si ceux-ci ont adsorbé au préalable C'1 et C'4, en formant un troisième complexe EAC'1C'4 dont la préparation est aisément réalisée par action du complément entier sur EA, soit à basse température (globules persensibilisés de Pillemer [5]), soit de préférence après élimination de Mg^{++} mais non de Ca^{++} (Levine et coll. [20]). L'expérience préliminaire résumée dans le tableau I nous a permis de vérifier ces données.

On voit à la lecture de ce tableau que :

a) C'1 est adsorbé par EA en l'absence de C'4. Cette adsorption ne progresse plus après dix minutes à 37°, elle n'est pas totale ; en effet, le surnageant, après avoir été séparé de EAC'1 par centrifugation, contient encore du C'1 libre qui peut se fixer sur de nouveaux globules EA, les préparant à l'action ultérieure de C'4, C'2 et C'3.

b) C'2 ne se combine pas avec le complexe EAC'1 déjà formé.

c) Il en est de même si C'2 est présent lors de la formation de ce complexe.

2° VITESSE DE FORMATION DU COMPLEXE EAC'1. — L'expérience précédente montre que la combinaison de EA avec C'1 est rapide. Les résultats rapportés dans le tableau II indiquent que le niveau d'équilibre entre C'1 fixé et non fixé s'établit en moins de trois minutes et que si la température n'a pas d'action nette sur la vitesse, elle en a une, bien que peu marquée, sur le niveau atteint.

En raison de cette rapidité de combinaison et du fait qu'elle s'opère même à basse température, il était difficile de réaliser des conditions expérimentales permettant de l'évaluer ; le procédé utilisé a mis à profit le phénomène décrit autrefois par Brand [2], à savoir que le chaînon moyen perd rapidement, en milieu légèrement alcalin, la propriété de lyser des globules sensibilisés lorsqu'on le mélange au préalable avec du chaînon terminal. Par contre, C'1 du chaînon moyen ainsi altéré reste néanmoins capable de se fixer sur les globules sensibilisés si on le fait agir en premier sur ces globules. Après fixation de C'1, l'addition ultérieure de chaînon terminal entraîne alors la lyse comme avec un chaînon moyen non modifié.

Sur le tableau II, les résultats de la ligne marquée « témoin 0 » sont obtenus avec une solution de chaînon moyen conservée quarante-huit heures à la glacière et mélangée avec celle de chaînon terminal immédiatement avant l'addition des globules. La distribution de ces trois réactifs dans l'ordre suivant : chaînon moyen, chaînon terminal, globules, était effectuée par deux personnes avec des seringues automatiques, afin d'assurer une

quasi-simultanéité. Les résultats rapportés dans la ligne suivante marquée 0 mn ont été obtenus de la même manière, mais en procédant à la distribution dans l'ordre : globules, chaînon moyen, chaînon terminal. Les différences de pourcentage d'hémolyse entre les deux lignes sont significatives à 37° et à 20°, mais beaucoup moins à 0°. On voit donc que lorsque les chaînons moyen et terminal sont mélangés aussitôt avant l'addition des globules, il en résulte une baisse notable de l'effet hémolytique.

TABLEAU II. — Vitesse de formation du complexe EA C'1.

Tempé- ratures Temps en mn.	37°	20°	0°
" Témoin 0 "	16,9	16,9	21
0	34,7	30,6	23,8
1	46,9	40,5	30,4
2	48	40,7	31,3
3	48,4	42,4	32,1
4	48	42,4	33,2
5	48,2	42	33,5
10	48,2	41,8	33,2
20	48	42	33
DOSES : Chaînon moyen I/I75, 1 ml ; Suspension globulaire, 1 ml ; Chaînon terminal I/I75, 1 ml.			

Les nombres rapportés dans les trois colonnes de droite représentent des pourcentages d'hémolyse.

Dans les tubes des lignes suivantes du tableau, l'addition de chaînon terminal qui inhibe partiellement, au moment même où elle est faite, l'activité du chaînon moyen résiduel non fixé, a été effectuée après les temps indiqués. On voit qu'à partir de la deuxième minute à 37°, de la troisième à 20° et 0°, le pourcentage d'hémolyse atteint un niveau constant, ce qui indique que la proportion de C'1 fixé n'augmente plus. On remarque aussi que le taux maximum de l'hémolyse diffère légèrement suivant la température de fixation. Ce fait n'est pas dû à l'emploi de chaînon moyen altéré, car il se reproduit avec une préparation récente ne donnant pas le phénomène de Brand. Les pourcentages d'hémolyse obtenus dans ce cas après trois minutes de contact préalable chaînon moyen-globules ont été de :

A 37°, 80 p. 100 ; à 20°, 72 p. 100 ; à 0°, 53 p. 100.

3° SENSIBILITÉ DU COMPLEXE EAC'1 A L'ACTION ULTÉRIEURE DES AUTRES COMPOSANTS. — L'expérience prouve que le degré de l'hémolyse produite par l'ensemble des trois composants C'4, C'2 et C'3 que l'on fait agir sur des globules sensibilisés ayant préalablement fixé C'1, varie d'une part suivant la quantité de C'1 fixé, et d'autre part avec la concentration des trois autres composants considérés ensemble ou isolément. La méthode qui paraît la plus simple pour l'étude de ce phénomène consiste à faire agir, sur un nombre fixe de globules sensibilisés, des préparations de chaînons moyen et terminal de concentration variable [21, 22]. Les auteurs s'accordent, en effet, à considérer le chaînon moyen comme renfermant seulement C'1 et C'3, le chaînon terminal contenant C'4, C'2 et aussi C'3. Si l'on fait donc agir le chaînon moyen en premier sur EA, seul C'1 peut se fixer, l'hémolyse ne survenant que lorsque le chaînon terminal apporte les deux composants manquants. L'action de C'1 est ainsi en quelque sorte dissociée.

TABLEAU III. — Pourcentages d'hémolyse en fonction des variations réciproques des chaînons moyen et terminal.

CHAÏNON MOYEN CHAÏNON TERMINAL	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Dilution de ch. moyen donnant 50% d'hémolyse
1			1,5	2	3,5	6	9	12,5	17	22,5	30	35	39	38	33	27	
2		2,5	3	3,5	5,5	9	13,5	19,5	25,5	32	40	46	51	50	46	38	11,65
3		4	4,5	6,5	8,5	14,5	20	26,5	35	44	53	60	64	65,5	62	56	9,65
4		5,5	7,5	10	14	21	29	37	47	57	67,5	75	79	79	76	70	8,30
5		8	10,5	14	20	29	39	49	59	70	81	87	90	90	87	81	7,10
6	9,5	12,5	16	20	28	38,5	49	60,5	71	80,5	89	94	96,5	96			6,05
7	12,5	16,5	21,5	27	38	49	61	72	82	89	94	97	97,5				5,08
8	16	21,5	28	36	48	61	72	82	89	95	98	100					4,20
9	21	29	36	46	60	72	82,5	90	96	99	100						3,25
10	26,5	34,5	44	57,5	70	81	89	95	99	100							2,40
11	30	37	49,5	60	73	85,5	92	96	100								2,10
12	30	36,5	50	60	72	82,5	87	90	96								2,10
13	24	30	45	54	65	73	79,5	84	88								2,50
14	9	13	20	29,5	44	56	67	74	79								4,45

Des dilutions de chaînon moyen en progression géométrique décroissante de raison 0,75 et dont le terme d'indice 10 correspond à une concentration de 1/40 (par rapport au volume initial du complément) ont été réparties à la dose fixe de 1 ml, dans une série de tubes contenant 1 ml de la suspension de globules sensibilisés. Le numérotage des dilutions représente la concentration des réactifs, il est donc établi dans le sens inverse de celui de la progression décroissante. La disposition de l'expérience est représentée dans le tableau III, tous les tubes d'une colonne verticale reçoivent la même dilution de chaînon moyen. Après

cinq minutes à 37° on répartit des dilutions, préparées de la même façon, de chaînon terminal exempt de C'1, mais cette fois en procédant par rangées horizontales. La lecture des résultats après 45 minutes à 37° est rapportée dans le tableau III. La représentation graphique est reproduite dans les fig. 1 et 2. On voit que, chacun des deux chaînons étant à concentration fixe, la variation, entre certaines limites, de la concentration de l'autre chaînon entraîne une variation des pourcentages d'hémolyse représentée par une courbe sigmoïde. Les différentes courbes sont à peu près parallèles entre elles dans leur partie moyenne. Pour les

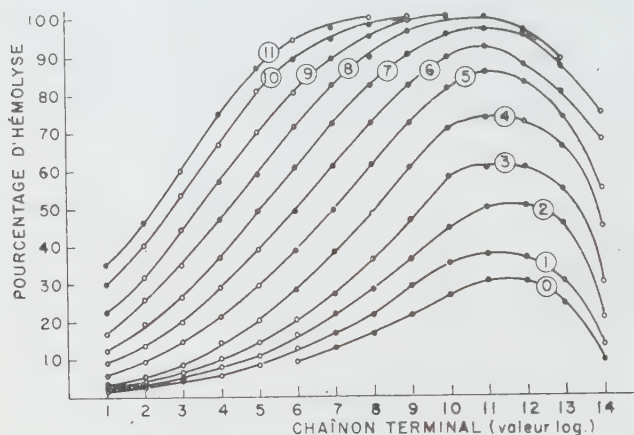


Fig. 1. — Variation du pourcentage d'hémolyse en fonction de la concentration du chaînon terminal.

Les numéros des courbes représentent la concentration (fixe pour chacune d'elles) du chaînon moyen. Les concentrations des deux chaînons sont exprimées en valeur log., l'échelle allant des indices 0 (dilution à 1/714,3) à 11 (1/30).

concentrations les plus basses de l'un ou l'autre des réactifs, le pourcentage d'hémolyse atteint, quand la concentration du chaînon variable devient assez élevée, un niveau maximum après lequel la courbe retombe en cloche, ce qui traduit un phénomène d'inhibition, observé constamment pour les deux chaînons pris en excès, et plus ou moins marqué suivant les échantillons de sérums. L'inhibition devient nette pour des concentrations qui se situent en général entre les indices 13 (1/16,87) et 15 (1/9,49) pour le chaînon moyen et 12 (1/22,5) et 14 (1/12,65) pour le terminal. Il apparaît clairement que pour chacun des chaînons, les sommets de la partie en cloche des courbes se trouvent sur une même ligne verticale dont l'abscisse représente une concentration optima de l'autre chaînon. Cette concentration optima permet

d'obtenir la plus forte hémolyse avec chacune des faibles concentrations du chaînon pris à dose variable. Si on choisit un pourcentage donné, 50 p. 100 par exemple, on peut définir l'unité 50 p. 100 minima de chacun des deux chaînons comme représentée par la concentration entraînant la lyse de la moitié du nombre des globules, lorsque l'autre chaînon est à sa concentration optima. C'est là le principe de la méthode de titrage d'Hegedüs et Greiner [23], mais on voit tout de suite qu'en raison du phénomène d'inhibition que provoque l'excès de l'un ou l'autre réactif, l'emploi de cette méthode ne conduit à des résultats précis que si l'on détermine d'abord la concentration optima de celui des

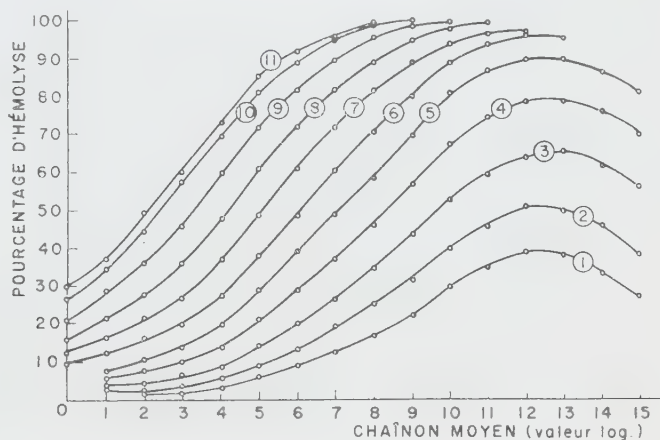


FIG. 2. — Variation du pourcentage d'hémolyse en fonction de la concentration du chaînon moyen.

Les numéros des courbes représentent la concentration (fixe pour chacune d'elles) du chaînon terminal.

deux chaînons servant au titrage de l'autre. Nous verrons, en ce qui concerne le titrage du premier composant du complément de cobaye, que cette méthode est d'application facile à la condition essentielle d'utiliser, comme il a été dit, une préparation de chaînon terminal débarrassé de C'1, ce qui est vérifié par l'absence totale d'action hémolytique de ce réactif agissant seul à forte concentration sur EA.

L'étude de l'ensemble des courbes d'hémolyse des figures 1 et 2 peut être synthétisée, en considérant la relation entre les concentrations variables des deux chaînons, permettant d'obtenir l'hémolyse d'un nombre fixe de globules. On a choisi le point correspondant au pourcentage 50 d'hémolyse qui, sur chacune

des courbes sigmoïdes, est presque constamment celui où se fait l'inflexion. La figure 3 représente la courbe que l'on obtient en portant les coordonnées exprimées en valeur logarithmique (à la même échelle) des concentrations des deux chaînons, qui, prises 2 à 2, lysent 50 p. 100 du nombre total des globules. On voit que dans sa partie moyenne la courbe se rapproche du tracé d'une droite; elle s'infléchit aux deux extrémités, zones où la concentration de l'un des deux chaînons s'abaisse considérablement. Il est intéressant de noter que l'inclinaison de la partie

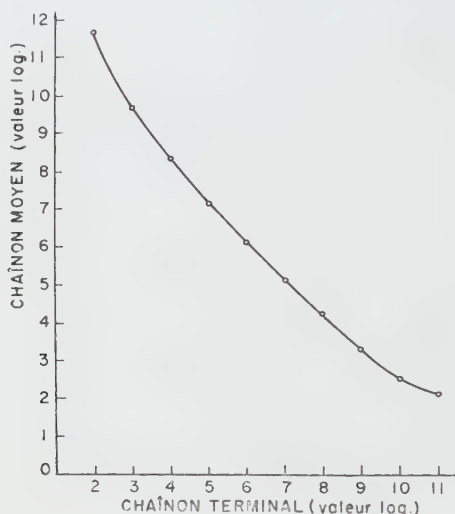


FIG. 3. — Concentrations exprimées en valeur log., à la même échelle, des chaînons moyen et terminal donnant 50 p. 100 d'hémolyse.

droite est 45° (pente -1); c'est là une observation que l'on retrouve presque toujours avec les préparations de chaînons moyens et terminaux obtenues à partir d'un mélange de plusieurs sérums de cobaye. La figure 4 montre qu'il en est de même pour la plupart des compléments lorsqu'ils proviennent chacun d'un seul cobaye. C'est donc un cas général, mais il n'en est ainsi qu'à condition d'utiliser des préparations purifiées, spécialement en ce qui concerne le chaînon terminal, qui ne doit pas contenir de trace sensible de C'l.

Comme il s'agit de graphique à coordonnées logarithmiques, l'obtention d'une droite de pente -1 signifie que la somme des logarithmes des concentrations des deux chaînons donnant 50 p. 100 d'hémolyse est fixe entre certaines limites; c'est-à-dire

que le produit de ces concentrations est égal à une constante. Cette constante caractérise une préparation donnée, elle varie suivant les sérums et, en particulier, d'après la teneur relative des deux chaînons en composants actifs.

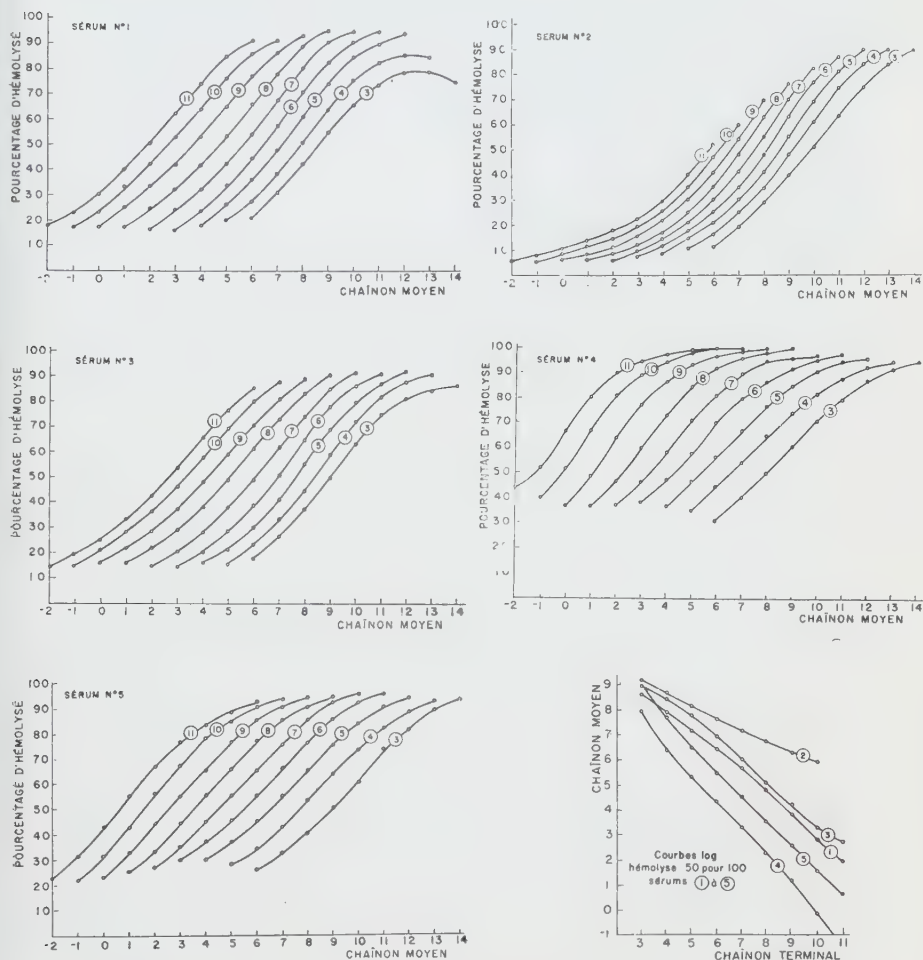


FIG. 4. — Variations individuelles des compléments.

D'autre part, en raison du parallélisme relatif, entre certaines limites de pourcentage (environ 20 et 80), des courbes d'hémolyse représentées dans les figures 1 et 2, on voit que la relation qui vient d'être établie pour l'unité 50 p. 100 peut être retrouvée

pour les pourcentages d'hémolyse compris entre 20 et 80 ; bien entendu, la constante diffère alors suivant le pourcentage. Autrement dit, entre certaines limites de concentration des réactifs d'une part et de l'intensité de l'hémolyse de l'autre, on peut dire que, d'une manière approchée, le degré d'hémolyse est une fonction linéaire du produit des concentrations des chaînons moyens et terminaux. Cette règle approximative a déjà été énoncée par Maltaner et Sternberger [21].

Les résultats représentés dans la figure 4, obtenus avec 5 sérums de cobaye différents, montrent que 4 sur 5 sérums ont donné une courbe du type que l'on peut dire normal, c'est-à-dire dont la partie moyenne se confond sensiblement, sur une assez grande longueur, avec une droite à 45°. Des examens de nombreux autres sérums effectués lors de la préparation de nos réactifs pour l'établissement des expériences suivantes ont confirmé que c'est là le type général ; on observe parfois, néanmoins, des exceptions, telle celle représentée par le sérum n° 2 dont la pente de la courbe, dans sa partie moyenne, s'éloigne nettement de 45°. Nous verrons dans la suite l'explication qu'on peut donner de ces anomalies.

Le rôle particulier de C'1 peut être précisé en limitant l'action de ce réactif au seul temps de fixation sur les globules. Pour cela le schéma de l'expérience précédente est repris, mais on centrifuge tous les tubes, après le séjour de cinq minutes à 37°, des mélanges chaînon moyen-globules sensibilisés. La centrifugation doit être effectuée à 37° car avec certaines préparations, contenant sans doute C'1 de mauvaise qualité, une réversion partielle de la fixation peut se produire lorsqu'on fait séjourner à la glacière un complexe EAC'1 obtenu à 37°. Après centrifugation, le surnageant, qui contient encore C'3 et une partie non fixée de C'1, est éliminé et remplacé par un volume égal d'une solution de même titre de chaînon moyen préalablement inactivé à 56°, donc dépourvu de C'1 mais rétablissant la teneur en C'3.

L'expérience est réalisée en double série : l'une est soumise à la centrifugation, l'autre ne l'est pas et sert de témoin. Les deux séries reçoivent le chaînon terminal comme précédemment. Les résultats sont représentés par la figure 5. Les deux courbes ont une allure générale assez voisine, mais elles sont lentement convergentes, la pente de la courbe supérieure (série centrifugée) étant plus forte que celle de la série témoin, sauf dans la partie droite, où elles tendent à se confondre. Cela signifie que la quantité de chaînon moyen, donnant 50 p. 100 d'hémolyse avec chacune des concentrations correspondantes de chaînon terminal, est constamment plus élevée dans la série centrifugée, et cela d'autant plus que la concentration correspondante de chaînon terminal est plus faible. Une explication simple peut être donnée

de ce phénomène : la quantité de C'1 résiduel éliminée par centrifugation est d'autant plus forte que la concentration initiale est plus élevée, et ainsi une partie de ce réactif — toujours faible sans doute, mais non négligeable pour les concentrations hautes — ne peut plus intervenir dans la suite du processus. Autrement dit, une proportion de C'1, non fixée par les globules après cinq minutes à 37° et en l'absence de C'4 et C'2, paraît agir néanmoins dans la suite du processus hémolytique ; cependant, sans être jamais importante, elle devient très minime pour les concen-

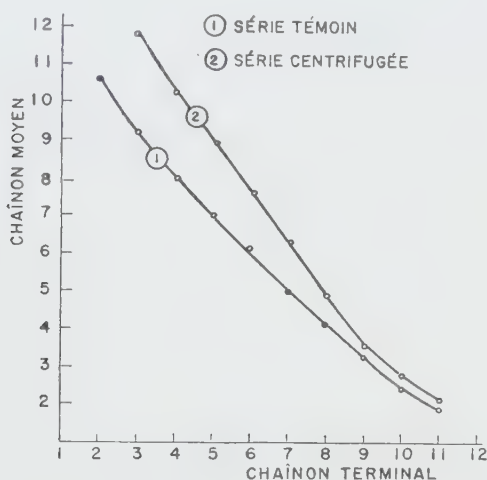


FIG. 5. — Changement de la courbe d'hémolyse 50 p. 100 suivant que l'action successive des deux chaînons est séparée (2) ou non (1) par centrifugation et rejet du surnageant.

trations faibles. Par exemple, dans l'expérience rapportée, la plus forte différence trouvée entre les deux unités 50 p. 100 de chaînon moyen correspondant à la concentration 3 (1/300) de chaînon terminal est de 1,2, ce qui signifie que les unités 50 p. 100 dans les deux séries sont entre elles dans le rapport de 1/1,4 environ.

L'inhibition par excès de chaînon moyen n'est pas observée lorsqu'on opère par centrifugation. Tout se passe comme s'il existait une saturation de EA par C'1, au delà de laquelle l'inhibition par excès ne se produit pas, et cela peut-être parce que le surnageant contient, à côté d'une fraction de C'1 susceptible d'intervenir encore dans l'hémolyse, des facteurs « anti-complémentaires » éliminés avec lui.

4° EQUILIBRE DE FIXATION DE C'1 SUR EA. — Les données précédentes suggèrent l'existence, pour chaque rapport de concentration entre le chaînon moyen et les globules sensibilisés, d'un niveau d'équilibre de fixation de C'1 par EA. S'il en est bien ainsi il doit exister une relation entre les proportions de C'1 fixé et non fixé. Les expériences entreprises pour vérifier cette hypothèse ont été faites comme les précédentes, c'est-à-dire, en maintenant constant le nombre de globules sensibilisés et en prenant pour variable la concentration de C'1; on mesurait ensuite la proportion de ce réactif non adsorbé.

On a déterminé d'abord la concentration optima de chaînon terminal, définie comme il a été dit et permettant de mettre en évidence la plus forte activité préparante de chaînon moyen: dans l'expérience rapportée elle était de 11 (1/30). Puis, 5 ml de chacune des dilutions successives de chaînon moyen allant de 3 (1/300) à 16 (1/7,12) étaient mélangés avec un volume égal de suspension globulaire. Après cinq minutes à 37° on éliminait les globules par centrifugation à la même température et les divers surnageants servaient à mesurer C'1 résiduel. Pour cela chacun d'eux était dilué en suivant la même progression géométrique décroissante de raison 0,75, le nombre de tubes de dilution variant naturellement avec la teneur initiale en chaînon moyen. On ajoutait ensuite 1 ml d'une suspension de globules sensibilisés à un égal volume de toutes les différentes dilutions, puis après cinq minutes à 37°, l'expérience était terminée par addition de 1 ml de chaînon terminal de concentration optima. En traçant la courbe, pour chaque surnageant, d'après les pourcentages d'hémolyse obtenus avec les différentes dilutions correspondantes, on en déterminait la concentration préparant 50 p. 100 des globules à l'hémolyse totale. Chaque unité 50 p. 100 ainsi définie était exprimée en valeur logarithmique ($\log_{0,75}$) du taux de dilution (1 correspondant au surnageant donnant, non dilué, 50 p. 100 d'hémolyse). La différence entre l'indice de la concentration initiale et celui du taux de dilution de l'unité 50 p. 100 représentait, en valeur logarithmique, le rapport entre les concentrations initiales et résiduelles de C'1. Pour les concentrations initiales 4 et 3, le surnageant, même non dilué, ne donnait pas 50 p. 100 d'hémolyse; l'unité a été alors calculée par approximation en se rapportant à une courbe établie avec des dilutions variables de la même préparation de chaînon moyen, mais n'ayant pas cette fois subi l'adsorption préalable par des globules EA.

Le graphique représentant, pour chacune des concentrations d'origine, les variations en valeur logarithmique du rapport $\frac{\text{C'1 initial}}{\text{C'1 résiduel}}$ est reproduit dans la figure 6. On voit que la pro-

portion de C'1 fixé varie suivant la concentration initiale ; la courbe présente un sommet dont l'abscisse est celle où le taux d'adsorption est le plus élevé. La limite de saturation se traduit nettement, à partir de la concentration 14 dans le cas présent, par une tendance de plus en plus marquée au parallélisme avec l'axe des abscisses (1).

Signalons qu'en deçà de la concentration 3, la partie résiduelle de C'1 étant très faible, son évaluation précise devient difficile ; néanmoins, même pour une concentration initiale de — 1 (1/952,38) le surnageant possède encore un faible pouvoir préparatoire résiduel pour les globules sensibilisés, preuve qu'il contient toujours du C'1 libre. Ces constatations expliquent pourquoi l'éli-

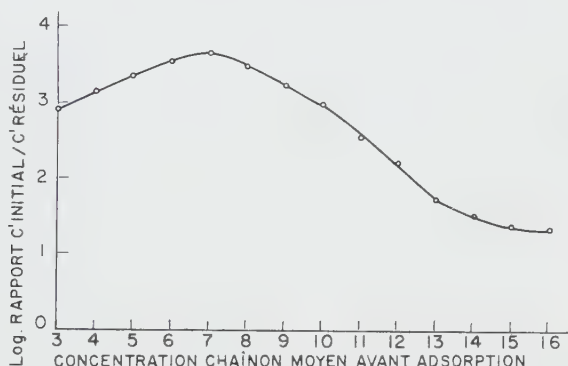


FIG. 6. — Variations du rapport de fixation de C'1 sur EA en fonction de la concentration initiale.

mination du premier composant par adsorption, sans être d'ailleurs jamais totale, nécessite, pour être pratiquement réalisée, plusieurs adsorptions successives avec des volumes importants de globules sensibilisés non dilués (voir technique). Une analogie existe avec ce que l'on observe pour les immunosérums adsorbés par l'antigène figuré correspondant (sérums anti-microbiens par exemple).

Que se passe-t-il si, l'équilibre d'adsorption de C'1 ayant été réalisé, on fait varier la concentration de ce réactif demeuré libre ? Tout d'abord l'expérience établit très aisément qu'aussi longtemps que le niveau de saturation n'a pas été atteint, une

(1) La valeur du rapport $\frac{C'1 \text{ initial}}{C'1 \text{ résiduel}}$ tend en effet vers une constante [1] lorsque la proportion de C'1 fixé devient très faible par rapport à celle restée libre.

augmentation de la teneur du milieu en chaînon moyen entraîne un nouveau niveau d'équilibre qui s'établit aussi vite que le premier et se manifeste par une plus grande sensibilité à la lyse par les trois derniers composants pris à la même concentration qu'auparavant. Inversement, le problème de la réversibilité du phénomène d'adsorption se pose aussi. Si la concentration de C'1 resté libre s'abaisse dans le milieu, la liaison EAC'1 déjà formée peut se dissocier partiellement; toutefois, la résistance remarquable du complexe aux lavages, même répétés, montre que la réversion s'opère lentement et d'une manière toujours faible. En fait, on retrouve pourtant constamment une teneur variable de C'1 dans les eaux de lavages successifs; cependant, la proportion ainsi extraite par l'eau salée isotonique tamponnée et additionnée ou non de Ca^{++} et de Mg^{++} ne dépasse pas, le plus souvent, quelques centièmes de la quantité fixée et tombe au-dessous de 1 p. 100 dès le troisième lavage; signalons pourtant que le degré d'extraction peut varier assez largement suivant les préparations de chaînon moyen et celles aussi de globules sensibilisés.

Un autre phénomène déjà signalé, et qui mérite de retenir l'attention, est l'influence de la température sur la stabilité du complexe EAC'1. D'une manière générale, la température optimale pour la formation de ce complexe est 37° ; il se constitue néanmoins très bien à des températures se rapprochant de 0° , mais on constate parfois que la proportion fixée est alors beaucoup plus faible qu'à 37° . A titre d'exemple extrême, notons qu'au cours d'une expérience une préparation récente de chaînon moyen donnait, à la dilution de 1/100, un niveau de fixation d'à peu près 90 p. 100 — à en juger par la proportion de C'1 résiduel contenue dans le surnageant — cela lorsque l'opération était conduite de bout en bout à 37° ; par contre, à 1° la proportion fixée tombait à 10 p. 100. Fait plus significatif, le complexe formé à 37° , et contenant 90 p. 100 du C'1 initial, en libérait plus du tiers lorsqu'on le portait ensuite pendant quinze minutes à 1° . Des phénomènes aussi marqués sont exceptionnels, le plus souvent il n'existe en moyenne que 20 à 30 p. 100 de différence entre les proportions de C'1 fixé à 37° et 1° . Il est possible, toutefois, que Pillemer et ses collaborateurs, qui ont particulièrement insisté sur l'instabilité de la combinaison EA C'1 [5], aient rencontré des faits de cet ordre.

5° INFLUENCE SUR L'INTENSITÉ DE L'HÉMOLYSE DES VARIATIONS RÉCIPROQUES DE CONCENTRATION ENTRE C'1 ET C'4 OU C'2. — On a vu que lorsque le complexe EAC'1 est soumis à l'action du chaînon terminal, le développement du processus hémolytique se poursuit par l'intervention successive de C'4 puis de C'2 [20].

L'étude précédente doit donc être complétée en considérant séparément l'influence des variations de chacun de ces deux composants.

Lorsque la concentration de C'2 était prise comme variable, le réactif apportant ce composant était du chaînon terminal préparé, comme il a été dit, à partir de complément privé de C'4 par un traitement préalable par l'hydrazine (une dialyse terminale éliminait les traces restantes de C'1). Pour étudier l'influence des concentrations variables de C'4 on utilisait du sérum de cobaye inactivé et adsorbé (voir technique). Ces réactifs ne contenaient respectivement que C'2 ou C'4 à l'exclusion de C'1, mais leur teneur d'origine en C'3 n'était pas modifiée. Le chaînon moyen contenant aussi C'3, on a considéré que la concentration du troisième composant était toujours suffisante pour ne pas changer sensiblement les résultats terminaux ; cette supposition s'est trouvée vérifiée par des expériences complémentaires.

Les schémas expérimentaux sont semblables à celui de l'expérience type déjà rapportée ; les dilutions de chaînon terminal ont seulement été remplacées par celles du réactif n'apportant que C'4 ou C'2, le composant manquant étant ensuite ajouté à dose fixe et élevée.

Le premier temps était le même : mélange à volumes égaux (*1 ml) de suspension de globules sensibilisés et de chacune des dilutions de chaînon moyen. Après cinq minutes à 37° on ajoutait dans tous les tubes :

1° Pour l'étude de l'influence de C'4 : 0,5 ml des différentes dilutions de sérum inactivé adsorbé (de concentration double de celles des dilutions correspondantes des réactifs distribués sous le volume de 1 ml), puis, après dix minutes à 37°, 0,5 ml de chaînon terminal-hydrazine à 1/15 (correspondant à 1 ml de la concentration 11).

2° Pour l'étude de l'influence de C'2 on utilisait les mêmes réactifs mais dans l'ordre inverse, celui à concentration fixe étant cette fois le sérum inactivé.

Les courbes obtenues sont représentées dans la figure 7 qui contient en outre la courbe de référence établie avec les chaînons moyens et terminaux provenant du même complément.

On voit que l'allure des trois courbes est comparable mais que la concentration de chaînon moyen donnant 50 p. 100 d'hémolyse est constamment plus faible quand un seul des deux composants (C'2 ou C'4) varie — l'autre étant en excès — que lorsqu'on les fait varier ensemble (chaînon terminal entier). Si, comme c'est le cas dans l'expérience représentée ici, les réactifs sont débarrassés de C'1 résiduel — ce que l'on vérifie par des tubes témoins —, l'inclinaison de la partie moyenne à peu près rectiligne des courbes marquées C'2 et C'4 (établies en fonction de l'un de ces compo-

sants pris comme variable) est plus faible que 45° . Il s'ensuit que les courbes tendent à converger avec celle de référence. De ce fait, les concentrations extrêmes les plus basses de chaînon moyen (C'1), donnant 50 p. 100 d'hémolyse avec les concentrations les plus élevées des autres composants, sont voisines pour les trois courbes ; on observe néanmoins rarement leur fusion : on voit plutôt, comme c'est le cas représenté dans la figure 7, que

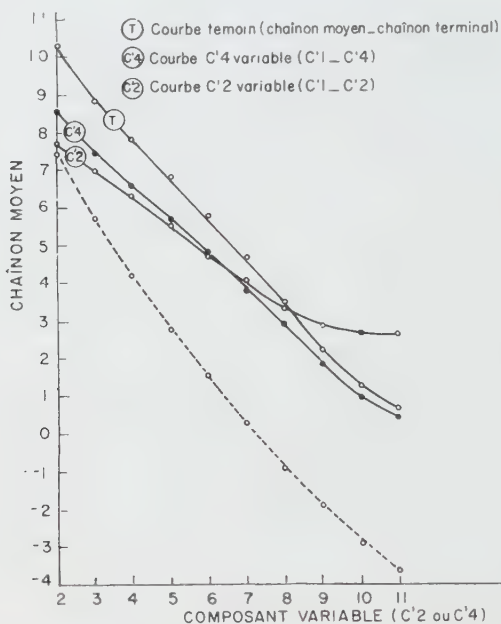


FIG. 7. — Concentrations de C'1 donnant 50 p. 100 d'hémolyse en fonction des concentrations variables de C'2 ou de C'4.

la courbe C'2, à l'inverse de celle de C'4, croise la courbe de référence et devient parallèle avant elle avec l'axe des abscisses. Ces constatations résultent sans aucun doute de la nature complexe des phénomènes en jeu ; les actions inhibitrices ou anti-complémentaires — ou parfois au contraire favorisantes — des réactifs varient considérablement suivant les préparations, l'ordre et les proportions dans lesquels on les mélange, leur degré de pureté, etc.

Les courbes sont différentes au cas où la solution de chaînon moyen traitée par l'hydrazine et dialysée, ainsi que celle de sérum inactivé, ne sont pas dépourvues d'un effet hémolytique, quand

on les fait agir seules sur des globules sensibilisés. Ce phénomène augmentant dans le même sens que la concentration des deux réactifs est révélateur de l'existence de C'1 résiduel. Ainsi, la courbe figurée en trait discontinu a été obtenue, dans le cas de C'4 pris comme variable, avec le même sérum inactivé, mais n'ayant pas été soumis à des adsorptions préalables pour éliminer la fraction de C'1, non détruite à 56°. On voit que la pente de cette courbe est plus forte, et que la zone extrême, où elle tend au parallélisme avec l'axe des abscisses, est située très bas, c'est-à-dire que la concentration minima de chaînon moyen, donnant 50 p. 100 d'hémolyse en présence d'un excès des autres réactifs, est dans ce cas extrêmement faible. Si, comme cela est fréquent lorsque la méthode d'Hegedüs et Greiner est utilisée pour titrer C'1, on opère dans des conditions expérimentales semblables à celles-ci où le composant à mesurer est lui-même présent dans les réactifs qui servent à son évolution, on aboutit à une conclusion manifestement erronée en ce qui concerne l'activité du premier composant ; c'est pourquoi, en pratique, il apparaît que la meilleure technique de titrage de C'1 consiste à utiliser le chaînon terminal, suffisamment mais non trop concentré (inhibition), et pour cela à en déterminer la concentration optima par une expérience préliminaire, comme il a été déjà dit, après s'être bien assuré que la préparation de chaînon terminal est totalement dépourvue de C'1 résiduel. Au surplus, l'exactitude parfaite d'un titrage, effectué même dans les meilleures conditions, est impossible en raison des multiples causes d'erreur tenant aux variations des réactifs ; par contre, un titrage relatif, permettant d'évaluer des concentrations différentes de C'1, mesurées en suivant la technique précédente avec les mêmes réactifs purifiés et conservés dans de bonnes conditions, est tout à fait possible.

Un dernier point restait à fixer : l'influence des variations réciproques de concentration de C'1 et de C'4 diffère-t-elle, suivant que C'4 agit seulement après ou, au contraire, en même temps que s'opère la fixation de C'1 sur EA. Pour le savoir, l'expérience dite « C'4 » a été établie en double ; d'une part, comme précédemment, en effectuant la distribution des réactifs dans l'ordre : chaînon moyen + globules EA et, après cinq minutes à 37°, dilutions de sérum inactivé, et d'autre part dans l'ordre : sérum inactivé + globules (mélange fait à 37°) et chaînon moyen ajouté en dernier. Les résultats obtenus ont été sensiblement identiques et les deux courbes ne différaient pas entre elles d'une manière significative.

6° MÉCANISME DE FORMATION DU COMPLEXE EA C'1. — De ce qui précède il résulte que l'adsorption de C'1 sur EA paraît être réellement le point de départ de tout le processus d'action hémolytique.

lytique du complément. De nombreux travaux ont montré [7, 25, 8, 9] que Ca^{++} pourrait bien constituer l'agent de liaison exclusif entre C'1 et EA [41]. En effet, le complexe EA C'1, suffisamment stable pour n'être que partiellement dissocié par des lavages répétés en eau salée isotonique, peut l'être rapidement et totalement par l'action d'un réactif s'unissant énergiquement au calcium, tel le citrate de Na, ou, mieux, le sel disodique de l'éthylène-diamine-tétra-acétique (EDTA). On sait que ce réactif forme avec Ca^{++} un complexe du type « chélate », soluble et chimiquement très stable. L'expérience a été réalisée de la façon suivante : dans des tubes contenant le même volume d'une suspension de globules sensibilisés ayant fixé C'1 — préparée à la température de 1° suivant la technique indiquée — on ajoute EDTA de façon à réaliser, toujours sous volume constant, une gamme de concentrations en progression géométrique décroissante de raison 1/2 et de premier terme : 5×10^{-3} M ; l'opération est conduite à 1°. Au bout de quinze minutes, temps après lequel, comme l'expérience le montre, l'action dissociante nettement progressive de EDTA n'augmente plus de façon nette, les tubes sont centrifugés à froid et les globules séparés des surnageants aussi soigneusement que possible par un essorage des parois des tubes avec un rouleau de papier filtre.

a) *Les culots globulaires* sont remis ensuite en suspension dans de l'eau salée tamponnée contenant 1 p. 100 de gélatine (2) et additionnée de Cl_2Mg [25] et de Cl_2Ca de façon à rétablir une teneur optima en Ca^{++} , compte tenu des traces de EDTA imbibant les culots. On ajoute alors dans tous les tubes le même volume d'un mélange de chaînon terminal et de sérum inactivé dépourvus de C'1 [chacun de ces réactifs ayant une concentration élevée (1/30)]. Les pourcentages d'hémolyse après quarante-cinq minutes au bain-marie à 37° sont rapportés sur la figure 8 en regard des concentrations de EDTA correspondantes (exprimées en valeur logarithmique). On voit que le traitement des globules EA C'1 par ce réactif peut supprimer totalement leur sensibilité à la lyse par un mélange ne contenant que les trois derniers composants (dans les conditions de l'expérience ce même mélange hémolysait à 100 p. 100 les globules n'ayant pas été en contact avec EDTA). L'effet de désensibilisation, d'abord total, n'est plus que partiel lorsque la concentration s'abaisse suffisamment, mais on voit que même lorsque EDTA tend vers les degrés extrêmes de dilution (le point 12 correspond à 3×10^{-6} M), son pouvoir de dissociation du complexe EA C'1 est longtemps

(2) L'addition de gélatine [OSLER (A. G.) et HILL (B. M.). *J. Immunol.*, 1955, 75, 137] est indispensable pour éviter une dénaturation rapide de C'1 libéré.

appréciable. Par contre, au moins dans la gamme des concentrations utilisées, EDTA ne produit aucun effet sur l'union des globules avec l'anticorps sensibilisant, car après dissociation du complexe EA C'1, on retrouve les globules à l'état EA, ayant certes perdu leur sensibilité à la lyse par un réactif ne contenant que C'4, C'2 et C'3, mais parfaitement lysables, par le complément entier. Les courbes d'hémolyse par un même complément obtenues avec les deux sortes de globules : 1° sensibilisés simples ; 2° libérés totalement du complexe par EDTA, se montrent identiques, ce qui permet de conclure que le traitement par EDTA

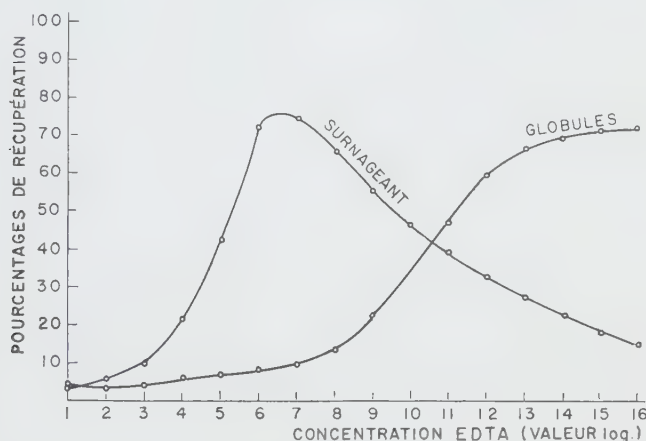


Fig. 8. — Dissociation de EA C'1 par EDTA de concentration variable.
Titrage de C'1 libéré et sensibilité à l'hémolyse des globules résiduels.

n'a eu, dans les conditions données de concentrations et de température, aucun effet sur l'anticorps fixé.

b) Les *surnageants* décantés sont également recalciifiés par addition de 1/200 de leur volume d'une solution de Cl_2Ca de molarité calculée pour rétablir une teneur optima en Ca^{++} , compte tenu de la présence de EDTA. L'existence de C'1 libre dans ces surnageants est aisément mise en évidence par addition de globules sensibilisés, qui peuvent alors être lysés par le mélange ne contenant que les trois derniers composants. Il est aisé de procéder au titrage de C'1 libéré, en opérant comme dans l'expérience représentée par la figure 6, c'est-à-dire en déterminant le taux de dilution de chaque surnageant donnant 50 p. 100 d'hémolyse dans les conditions indiquées. La comparaison entre les concentrations ainsi calculées (unités 50 p. 100 de chaque surnageant) avec celles correspondantes de la solution

de chaînon moyen ayant servi à la sensibilisation des globules (soumis ensuite à EDTA) permet de calculer le rapport exprimant en pourcentage le taux de récupération de C'1 libéré par chacune des différentes concentrations de EDTA. Les résultats sont représentés sur la figure 8 en même temps que ceux fournis, ainsi qu'il vient d'être exposé, par les globules correspondants. Dans l'expérience rapportée, les tubes témoins donnant les pourcentages d'extraction par l'eau salée tamponnée non additionnée de EDTA au cours de trois lavages successifs du même nombre de globules EA C'1 ont montré que l'extraction n'était respectivement que de 2 p. 100, 1,76 p. 100 et 1,15 p. 100 de la quantité de C'1 initialement fixée. On voit qu'en comparaison de ce qu'extrait l'eau salée ordinaire, le même liquide, additionné de EDTA, possède un pouvoir de dissociation très élevé, qui décroît beaucoup plus lentement que celui de ce réactif. Il existe une concentration ($7,5 \times 10^{-5}$ M), aux alentours de laquelle la récupération est maxima; ce phénomène semble dû au fait que le réactif dissociant détruit une partie de C'1 libéré, d'autant plus importante qu'il est lui-même plus concentré. D'ailleurs, les solutions de C'1 obtenues par dissociation du complexe se montrent instables, même en milieu gélatiné, dans les conditions où les solutions normales de chaînon moyen se conservent parfaitement; il est probable que la particulière fragilité de C'1 libéré explique pourquoi le taux de récupération ne s'élève qu'exceptionnellement au-dessus de 70 p. 100.

On voit, en outre, d'après la figure 8, que lorsque EDTA est très dilué et que la dissociation n'est que partielle — ce que montre la persistance de la sensibilité des globules au réactif contenant C'2, C'3, C'4 — la libération de C'1 peut encore être considérable. En fait, il est ainsi possible de retirer d'un complexe EA C'1, dans lequel C'1 est à son degré d'adsorption maximum — et sans en modifier la sensibilité à la lyse par le mélange contenant les trois autres composants à concentration élevée — assez de C'1, pour rendre de nouveaux globules EA aussi sensibles que les premiers à l'action du même réactif. Ce fait n'a rien de surprenant, puisque les résultats déjà rapportés nous ont montré que EA peut fixer des proportions variables de C'1; lorsqu'on se rapproche de la saturation, l'effet hémolytique ne peut plus être dépassé même si la quantité de C'1 adsorbée est en excès par rapport à la concentration des trois autres composants.

Signalons en terminant que les expériences sur la dissociation de EA C'1 par EDTA ont été reprises avec d'autres compléments que celui de cobaye, en l'espèce des sérums frais d'homme, de porc et de rat blanc. Les résultats ont été absolument semblables, quelle que soit la provenance du sérum. Les complexes EA C'1

formés ont été inhibés par EDTA et C'1 a été retrouvé dans le surnageant recalcifié, comme dans le cas du sérum de cobaye ; les concentrations optima de EDTA permettant de récupérer le maximum de C'1 ont été aussi de même ordre. L'exemple le plus intéressant est celui du complément de rat, non seulement en raison du pouvoir hémolytique élevé de ce réactif qui le rapproche de celui de cobaye, mais aussi parce qu'il n'est pas sensible (à l'opposé de ce dernier) à l'action protectrice de Ca^{++} contre l'inactivation spontanée de C'1 à 37°. Malgré cette propriété qui aurait pu faire douter du rôle actif de Ca^{++} , il s'est comporté de façon tout à fait semblable à celle du complément de cobaye.

Considérations générales.

Des globules sensibilisés, traités par une solution de chaînon moyen puis centrifugés et lavés, sont lysés par un mélange de chaînon terminal et de sérum inactivé qui contient tous les composants du complément, sauf le premier ; par contre, ce même mélange ne lyse pas des globules sensibilisés non préparés par le chaînon moyen. Quantitativement, le pouvoir lytique d'un complément donné ne diminue que faiblement, lorsqu'on sépare ainsi l'action de ses deux chaînons au lieu de les faire agir ensemble, sans fractionnement préalable du complément. La seule explication de ces faits est que C'1 du chaînon moyen se fixe sur EA en formant un complexe suffisamment stable pour résister aux lavages et qui peut être lysé par les trois derniers composants. Conforme aux données anciennes jamais infirmées, la possibilité de préparer ainsi le complexe stable EAC'1 ne peut être mise en doute.

La fixation de C'1 par EA s'opère — ou tout au moins peut être obtenue — indépendamment de celle de C'4 qui serait pourtant simultanée quand ces composants sont tous deux présents, comme c'est le cas au cours de la lyse de globules sensibilisés par le complément non fractionné [8, 9]. Il est significatif que l'effet préparant du chaînon moyen n'est pas modifié si ce réactif provient non pas d'un sérum normal de cobaye, mais du même sérum débarrassé de C'4 par action préalable de l'hydrazine. Ce ne sont donc pas des traces de C'4, présentes éventuellement dans le chaînon moyen, qui peuvent expliquer la fixation de C'1.

Ca^{++} , indispensable dans l'hémolyse par le complément [7], intervient, comme les travaux de Levine et de ses collaborateurs l'ont montré, aux premiers temps de l'action hémolytique. Nos expériences confirment que c'est la liaison EA C'1 qui s'effectue par l'intermédiaire de Ca^{++} . En effet, bien qu'il résiste à des lavages répétés à 37° par de l'eau salée exempte de calcium, le

complexe EAC'1 peut être rapidement et totalement dissocié par un composé tel EDTA, qui s'unit avec Ca^{++} en formant un chélate chimiquement inactif. Les deux constituants du complexe ainsi séparés peuvent retrouver, après recalcification, une grande partie ou même la quasi-totalité de leurs propriétés biologiques initiales. Ces faits cadrent avec l'hypothèse énoncée dans un travail antérieur : la forme active de C'1 paraît être un complexe protéido-calcique existant sans doute dans le sérum ; ils sont également compatibles avec l'hypothèse de certains auteurs [26, 27, 28] qui considèrent C'1 comme un enzyme dont Ca^{++} pourrait être le co-enzyme.

Quant au mécanisme d'action de EDTA, on peut supposer que ce composé forme avec C'1, par l'intermédiaire de Ca^{++} , un complexe chélaté inactif — EDTA prenant la place des globules — ou encore qu'il déplace simplement Ca^{++} , agent de liaison entre C'1 et EA, libérant ainsi C'1 sous sa forme inactive à laquelle des ions calcium libres peuvent ensuite rendre la faculté de se fixer sur des globules sensibilisés. Dans la première hypothèse, la réactivation par Ca^{++} détruirait l'équilibre du complexe C'1-EDTA, permettant ainsi à C'1 de retrouver son activité d'origine en le libérant du chélate.

Le nombre de globules restant constant ainsi que la température, le degré de fixation de C'1 sur EA est fonction de la concentration de C'1. A côté de la partie enlevée par adsorption, il existe toujours une certaine proportion de C'1 restée libre dont l'effet dans la suite du processus lytique — lié à l'intervention des trois autres composants — est peu important, ou même pratiquement nul dans le cas de concentrations initiales faibles.

Bien que le déclenchement et la poursuite du processus paraissent conditionnés par la formation préalable du complexe EA C'1, le degré d'adsorption de C'1 sur EA ne détermine pas à lui seul l'intensité de l'hémolyse ; la concentration absolue et relative des trois autres composants intervient aussi de façon déterminante. Les faits rapportés suggèrent qu'à chacun des stades successifs où l'un des composants entre en jeu, la fixation de ce composant est fonction, d'une part de sa concentration absolue et, d'autre part, de sa concentration relative avec chacun des composants dont l'action a précédé la sienne. A chaque stade, il doit exister un état de saturation obtenu dès que la concentration du composant en cause atteint un niveau suffisant. Le cas particulier de C'3 n'a pas été abordé jusqu'ici, mais on a tout lieu de penser qu'il se comporte de façon similaire. Quant à C'1, le premier fixé, son adsorption est conditionné de façon absolue et relative par le degré de sensibilisation des globules par l'anti-corps.

La règle formulée par Hegedüs et Greiner [23] : l'intensité de

la lyse est fonction de la concentration absolue d'un seul des quatre composants à condition que les trois autres soient présents en excès, n'est qu'un cas extrême des constatations rapportées. Son application au titrage d'un composant se heurte, dans la pratique, à de nombreuses causes d'erreur : en particulier des phénomènes d'inhibition par excès, couramment enregistrés. Une précision, toute relative d'ailleurs, ne peut être obtenue qu'en déterminant au préalable la concentration optimale du réactif servant au titrage.

L'hypothèse la plus simple pour expliquer les faits observés est que la série des réactions échelonnées qui aboutit à l'hémolyse d'un globule n'est pas forcément complète en tous les points de sa surface où s'est fixé en premier l'anticorps. A chaque pas, le nombre des points où une série commencée se poursuit, dépend de la concentration du composant en cause et du nombre des points touchés à chacun des stades précédents ; seuls comptent en définitive ceux où la série complète s'est achevée, l'hémolyse ne se produisant que si le nombre en est suffisant. Il semble bien que chacun des stades successifs relève, en fin de compte, des mêmes lois d'adsorption.

Si l'hypothèse précédente est exacte, il ne s'ensuit pas que l'action d'un complément entier procède obligatoirement par stades échelonnés, dépendant certes étroitement les uns des autres mais néanmoins distincts. Les faits observés trouveraient aussi une explication logique si le complément, agissant en bloc, n'était qu'une substance unique dont les molécules scindées artificiellement paraîtraient dépourvues d'effet lytique aussi longtemps qu'elles ne se seraient pas reconstituées à la surface du globule. C'est l'hypothèse de Johns [29], à l'appui de laquelle on peut observer que l'intensité de la lyse est fonction (entre certaines limites) du produit des concentrations des deux chaînons d'un même complément, ce qui traduit l'existence d'un certain équilibre entre eux. Cela ne peut s'expliquer que si les concentrations relatives des divers composants pris 2 à 2 varient peu ; il en serait ainsi évidemment si le complément ne constituait qu'une molécule unique. Toutefois, il y a des exceptions à cette règle qui, jointes à d'autres données telle l'action favorisante de Mg^{++} [7, 8, 9], cadreraient beaucoup mieux avec l'hypothèse de Levine et de ses collaborateurs [8, 9, 20], considérant l'action du complément comme fractionnée en au moins deux phases ; au cours de la première, conditionnée par Ca^{++} , C'1 et C'4 se fixeraient sur EA [20]. Observons que les faits que nous avons rapportés tendent à limiter le rôle de Ca^{++} à la fixation de C'1, mais il apparaît possible que C'1 et C'4 ne forment qu'une molécule unique dont la partie pouvant se fixer sur EA est celle-là même que l'on peut séparer sous forme du premier composant.

Résumé et conclusions.

1° Le premier stade du processus aboutissant à l'hémolyse par le complément de globules sensibilisés (EA) paraît être la liaison de C'1 avec EA par l'intermédiaire de Ca^{++} .

2° Le complexe EAC'1 (préparé par simple mélange de EA avec le chaînon moyen) est stable, résiste aux lavages et se forme très rapidement à des températures comprises entre 37° (optimum) et 0°. Il peut être totalement dissocié en ses constituants (non modifiés) par action de EDTA s'unissant à Ca^{++} .

3° Entre certaines limites de concentration des réactifs, et si l'on maintient constant le nombre de globules et le degré de leur sensibilisation par l'anticorps A, l'intensité de l'hémolyse est fonction :

a) De la quantité de C'1 fixée par EA, qui, pour une température donnée (37°) ne dépend, dans ces conditions, que de la concentration absolue de C'1 ;

b) Des concentrations relatives entre, d'une part, C'1 déjà fixé et, d'autre part, C'4 et C'2 agissant à la suite et considérés ensemble (chaînon terminal) ou isolément.

Cette relation est représentée, pour un pourcentage d'hémolyse donné compris entre 20 et 80, par une courbe logarithmique dont la partie moyenne est en général une droite à 45° ; dans cette zone le produit des concentrations des deux chaînons : moyen (C'1) et terminal (C'4, C'2) est égal à une constante dont la valeur est proportionnelle au degré d'hémolyse.

4° Des hypothèses sont envisagées sur le développement du processus hémolytique qui paraît procéder par stades successifs, chacun étant marqué par l'intervention d'un des composants se fixant en fonction de sa concentration absolue et de celle du ou des composants dont la fixation doit précéder la sienne. Toutefois l'hypothèse d'une action du complément en bloc ou par groupes partiels des composants n'est pas incompatible avec les données rapportées.

SUMMARY.

STUDIES ON THE COMPLEMENT.

II. FIRST STAGES OF THE HAEMOLYTIC ACTION OF COMPLEMENT.

WITH SPECIAL REGARD TO THE ROLE OF THE FIRST COMPONENT.

Sensitized sheep erythrocytes (EA) have been found capable of fixing C'1 from purified mid-piece of guinea-pig C'. The conditions of formation and the properties of the stable complex EAC'1 have been studied. The uptake of C'1 by EA is always

partial and a definite relation exists between the initial concentration of C'1 and the amount of its fixation. A saturation level can be reached.

It has been confirmed that Ca^{++} is the binding agent of C'1 fixation. The complex EAC'1 can be broken up by EDTA, liberating, unaltered, the elements of the complex.

The degree of hemolysis is a function of the relative concentrations of C'1, fixed by EA and of C'4 or C'2 fixed afterwards and varying together or separately. Within some limits of the hemolysis percentage (20 and 80 p. 100) and of the concentration of the reagents, the degree of lysis is proportional to the product of the concentration of C'1 and of that of C'2 and (or) C'4.

The significance of the data obtained is discussed with regard to the immune hemolysis process which appears to consist of a sequence of different steps, each of them involving the intervention of a component, fixed in function of its concentration and of that of the component(s) the action of which must precede its own. Consequently, for lysis, it is necessary to count only the points of the surface of one red cell where the series of the successive fixations has been complete.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] FERRATA (A.). *Berl. klin. Wschr.*, 1907, **44**, 366.
- [2] BRAND (E.). *Berl. klin. Wschr.*, 1907, **44**, 1075.
- [3] HEIDELBERGER (M.), WEIL (A. J.), TREFFERS (H. P.). *J. exp. Med.*, 1941, **73**, 695.
- [4] PILLEMER (L.), CHU (F.), SEIFTER (S.) et ECKER (E. E.). *J. Immunol.*, 1942, **45**, 51.
- [5] PILLEMER (L.), SEIFTER (S.), CHU (F.) et ECKER (E. E.). *J. exp. Med.*, 1942, **76**, 93.
- [6] PILLEMER (L.). *Chem. Rev.*, 1943, **33**, 1.
- [7] MAYER (M. M.), OSLER (A. G.), BIER (O. G.) et HEIDELBERGER (M.). *J. exp. Med.*, 1946, **84**, 535.
- [8] LEVINE (L.), OSLER (A. G.) et MAYER (M. M.). *J. Immunol.*, 1953, **71**, 374.
- [9] MAYER (M. M.), LEVINE (L.), RAPP (H. J.) et MARUCCI (A.). *J. Immunol.*, 1954, **73**, 443.
- [10] LAPORTE (R.), HARDRE DE LOOZE (L.) et SILLARD (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 16.
- [11] LAPORTE (R.), HARDRE DE LOOZE (L.) et SILLARD (R.). *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **242**, 576.
- [12] PILLEMER (L.), SEIFTER (S.) et ECKER (E. E.). *J. Immunol.*, 1941, **40**, 89.
- [13] PILLEMER (L.) et ECKER (E. E.). *J. biol. Chem.*, 1941, **137**, 139.
- [14] PILLEMER (L.), BLUM (L.), LEPOW (I.), WURZ (L.) et TODD (E. W. J.). *J. exp. Med.*, 1956, **103**, 1.

- [15] BIER (O. G.), LEYTON (G.), MAYER (M. M.) et HEIDELBERGER (M.). *J. exp. Med.*, 1945, **81**, 449.
- [16] GORRILL (R. H.) et HOBSON (D.). *Bull. Hyg.*, 1952, **27**, 1.
- [17] KABAT (E. A.) et MAYER (M.). *Experimental Immuno-chemistry*, C. C. Thomas, édit., Springfield, 1948.
- [18] ECKER (E. E.), PILLEMER (L.) et SEIFTER (S.). *J. Immunol.*, 1943, **47**, 181.
- [19] MUTSAARS (W.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, **73**, 379.
- [20] LEVINE (L.), MAYER (M. M.) et RAPP (H. J.). *J. Immunol.*, 1954, **73**, 435.
- [21] MALTANER (F.) et STERNBERGER (L. A.). *Annual Report, Division of Laboratory and Research, N. Y. state Dept. of Health*, 1950, 14.
- [22] SILVERSTEIN (A. M.). *J. Immunol.*, 1954, **72**, 187.
- [23] HEGEDÜS (A.) et GREINER (H.). *Z. Immunitätsf.*, 1938, **92**, 1.
- [24] RICE (C. E.) et CROWSON (C. N.). *J. Immunol.*, 1950, **65**, 201.
- [25] MAYER (M. M.), CROFT (C. C.) et GRAY (M. M.). *J. exp. Med.*, 1948, **88**, 427.
- [26] LEPOW (I. H.), WURZ (L.), RATNOFF (O. D.) et PILLEMER (L.). *J. Immunol.*, 1954, **73**, 146. — LEPOW (I. H.) et PILLEMER (L.). *J. Immunol.*, 1955, **75**, 63.
- [27] LEVINE (L.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1955, **48**, 283.
- [28] BECKER (E. L.). *Nature*, 1955, **176**, 1073 ; *Fed. Proceed.*, mars 1956
- [29] JOHNS (R. G. S.). *Biochemical Society Symposia*, 1953, n° 10, p. 83, Cambridge Univ. Presse, édit.

MILIEUX DE CULTURE ET MÉTHODES D'ISOLEMENT POUR LES STREPTOCOQUES ET LES PNEUMOCOQUES

par R. WAHL et P. MEYER (*)

(*Institut Pasteur*)

Le rôle pathogène des streptocoques semble de plus en plus important. Etant donné les difficultés toujours grandes de leur isolement et l'hétérogénéité du genre *Streptococcus*, il nous paraît utile d'exposer ici les méthodes que nous employons à l'Institut Pasteur sans exclure certains points, apparemment connus, mais dont l'application nous semble indispensable à une bonne technique d'isolement.

A. — Milieux de culture.

Nous décrirons d'une part les milieux liquides et d'autre part les milieux solides et, dans chacune de ces catégories, nous séparerons les milieux destinés aux cultures courantes, à la conservation des souches et aux cultures sélectives (1).

Il paraît préférable de remplacer, partout où cela est possible, la macération de viande et les produits de digestion enzymatique préparés au laboratoire par un extrait de viande et une peptone de fabrication industrielle, car les produits préparés au laboratoire varient suivant la matière première employée, laquelle est chaque fois différente. Mais les produits commerciaux doivent être sélectionnés par des essais nombreux, car certains seulement sont appropriés à la culture des streptocoques. La macération de viande doit cependant être encore utilisée dans quelques cas (culture des pneumocoques, peut-être de certaines souches de streptocoques ; préparation des vaccins contenant les antigènes de groupe ou de type, pour l'immunisation des animaux.)

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 7 juin 1956.

(1) Presque tous ces milieux sont tamponnés avec des phosphates et sont glucosés, ce qui impose des précautions particulières pour l'autoclavage. Les pressions indiquées doivent être rigoureusement maintenues pendant toute sa durée, ce qui implique un contrôle et un étalonnage fréquent du manomètre. Beaucoup d'insuccès des cultures sont dus à une erreur dans ces opérations.

I. — MILIEUX LIQUIDES

I. MILIEUX COURANTS.

1° Bouillon à l'extrait de viande (E. T. G.).

H ₂ O	1 000,0
Peptone pancréatique de fibrine	20,0
Extrait de viande	5,0
NaCl	2,5
Ajuster à pH 7,8 avec NaOH N/1	
Ajouter : PO ₄ H ₂ K	9,7
PO ₄ HNa ₂ 12 H ₂ O	8,3
Précipiter vingt minutes à 1 kg de pression.	
Ajouter : Glucose	1,0
Répartir : Autoclaver vingt minutes à 500-750 g de pression.	

L'extrait de viande employé, fourni par les Etablissements Liebig (extrait pour bactériologie), provient d'un lot préalablement sélectionné comme donnant les meilleures cultures parmi plusieurs lots de même provenance. D'autres extraits de viande peuvent être employés après sélection empirique de l'échantillon le plus favorable à la culture.

Nous avons utilisé ici une peptone pancréatique de fibrine fournie par les Etablissements « Réactifs ». D'autres peptones peuvent être employées, à condition de vérifier leur efficacité, car beaucoup ne conviennent pas.

Il ne faut pas utiliser l'eau potable de certaines villes (Paris), car elles contiennent fréquemment des doses d'antiseptiques empêchant ces cultures. Il faut donc employer : de l'eau de rivière, de puits, de source, filtrée sur papier ou de l'eau distillée en récipients de verre.

2° Bouillons-macération de viande peptonés.

Ces milieux, comme nous l'avons dit, sont à réserver à des cas particuliers, c'est-à-dire aux cultures des pneumocoques et de certaines souches de streptocoques pour lesquelles les milieux à l'extrait de viande ne donnent pas de bons résultats. Mais, comme nous l'avons vu, ils sont plus irréguliers que ceux-ci.

a) Bouillon-macération, bipeptoné :

Macération (viande de bœuf)	1 000,0
Peptone pancréatique de viande (1)	10,0
Peptone pepsique de viande (1)	10,0
Ajuster à pH 7,8 avec NaOH N/1.	
NaCl	2,5
Na ₂ PO ₄ 12 H ₂ O	8,3
K PO ₄ H ₂	0,7
Autoclaver vingt minutes à 1 kg, filtrer sur Durieux dur.	
Glucose	2,0
Répartir et stériliser trente minutes à 500 g de pression.	

(1) De même provenance que la peptone pancréatique de fibrine.

b) *Bouillon Todd-Hewitt modifié* (2).

Il est utilisé uniquement pour la préparation des vaccins, destinés à l'immunisation des animaux (préparation des sérums de groupe et de type).

3° *Bouillon-macération-digestion* (bouillon Martin modifié).

Ce milieu n'est plus utilisé que dans les cas exceptionnels où tous les milieux précédents ont donné une culture pauvre. Il peut arriver (rarement) qu'il donne de meilleurs résultats que ceux-ci.

Macération de viande de bœuf	500,0
Digestion de viande et foie de bœuf	500,0
Ajuster à pH 7,8.	
K ₂ PO ₄ H ₂	0,7
Na ₂ PO ₄ H.12 H ₂ O	0,3
Précipiter vingt minutes à 1 kg de pression. Filtrer sur Durieux dur.	
Glucose anhydre	2,0
Autoclaver vingt-cinq minutes à 500 à 750 g de pression.	

La macération de viande et la digestion pepsique sont préparées comme suit :

Macération de viande :

H ₂ O	1 000,0
Viande de bœuf (hachée)	500,0

Vingt-quatre heures à +4°. Puis quinze minutes à 100°. Filtrer sur Durieux dur. Répartir. Autoclaver vingt minutes (1 kg).

Digestion pepsique de viande et foie :

H ₂ O	1 000,0
Viande de bœuf (hachée)	225,0
Foie	25,0
Porter à 45-50°. Ajouter :	
HCl	8,0
Pepsine (titre 500)	0,5

Vingt-quatre heures à 50°. Remuer. Puis porter à 85°. Filtrer (toujours à chaud sur filtre Durieux mou). Répartir. Autoclaver vingt minutes (1 kg).

(2) Première formule de Todd et Hewitt [7], mais avec précipitation quinze minutes à 1,0 kg, et en utilisant la peptone de fibrine, à la place de la protéose peptone Difco.

4° Eau hyperpeptonée (E. P. B.).

L'eau hyperpeptonée ne convient pas pour les cultures courantes et doit être réservée à l'étude des fermentations par une souche pure.

H ₂ O	1 000,0
Peptone fibrine	50,0
NaCl	5,0
Bleu de bromothymol (3)	10,0
(en sol. alcal. à 0,2 p. 100).	

Ajuster à pH 7,6 avec NaOH. Précipiter vingt minutes à 1 kg de pression. Filtrer sur Durieux dur. Répartir. Autoclaver vingt minutes (500 à 750 g).

On remarquera qu'une quantité de peptone beaucoup plus grande que dans le bouillon est nécessaire.

2. MILIEUX ENRICHIS. — Ces milieux sont réservés à la culture de certaines souches « exigeantes » et à la conservation des souches. Ils sont préparés en ajoutant, aux divers bouillons, du sérum, du lysat globulaire du sang ou de l'ascite (4).

a) *Sérum* de cheval stérilisé par filtration, ajouté au bouillon à raison de 10 à 20 p. 100.

b) *Lysat globulaire* : globules de cheval lysés par deux volumes d'H₂O distillée. Le lysat centrifugé et stérilisé par filtration est ajouté au milieu à raison de 2 à 4 p. 100.

c) *Sang* de cheval ou de lapin (défibriné) ajouté à raison de 5 p. 100.

d) *Ascite humaine*, 5 à 10 p. 100.

3. BOUILLON SÉLECTIF POUR LES STREPTOCOQUES. — L'emploi du cristal violet et de l'azothydrate de sodium a été recommandé par plusieurs auteurs [1, 2]. La méthode suivante paraît apporter une amélioration à celles qui ont été utilisées.

Préparer le mélange suivant :

H ₂ O	51,0
Sang de cheval défibriné	20,0

(3) Cet indicateur a été choisi pour des raisons indiquées dans un travail précédent [9].

(4) Ils ne sont pas utilisables pour la préparation des extraits de Lancefield.

Agiter pour l'hémolyse :

Solution de cristal violet à $\frac{1}{10\,000}$	20,0
Solution de NaN_3 à $\frac{1}{20}$	9,0

N. B. — Ce mélange peut être préparé à l'avance en ampoules scellées conservées à $+4^\circ$ (pendant six mois au maximum).

Ajouter 1 ml du mélange pour 10 ml de bouillon E. T. G.

II. — MILIEUX SOLIDES ET SEMI-SOLIDES.

1° GÉLOSE AU SANG. — C'est le milieu fondamental pour l'isolement des colonies. Il permet en même temps l'étude de l'hémolyse.

Elle se prépare ainsi :

Bouillon E T G (5) gélifié à 1,5 p. 100..... 100,0 ml.

Liquéfier par ébullition. Ramener à $45-50^\circ$.

Ajouter : *Sang de cheval*, prélevé par ponction veineuse, défiliné (sur billes de verre), conservé à $+4^\circ$, pas plus de dix jours, ramené à $37-40^\circ$ au moment de l'emploi..... 5,0 ml.

Homogénéiser et couler le mélange en boîtes de Petri (20 ml environ par boîte de 10 cm de diamètre). Eliminer l'eau de condensation et vérifier la stérilité par séjour de douze à dix-huit heures (au maximum) à 37° , la boîte renversée. Les boîtes doivent être conservées ensuite à la température du laboratoire et utilisées dans les quatre jours.

On choisit un sang de cheval ayant un taux d'antistreptolysine O inférieur à 100 U. A. S./cm³. On peut utiliser le sang de lapin, avec des résultats à peu près superposables.

Le sang de mouton, utilisé dans certains laboratoires, donnerait des résultats peu différents. Nous n'en avons pas l'expérience. Par contre, le sang humain doit être absolument proscrit (6).

(5) On a discuté si le glucose était favorable ou non à l'hémolyse. Nos essais comparatifs n'ont pas montré de différence, et nous utilisons le bouillon glucosé.

(6) Le sang humain donne des réactions très différentes de celles du sang de cheval :

a) Il contient souvent un taux assez élevé d'antistreptolysine O et il est même parfois inhibiteur de la streptolysine S [6] ;

b) La fragilité des globules humains est variable ;

c) La sensibilité même de ces globules aux hémolysines des streptocoques des différents groupes est différente de celle des globules de cheval.

2° MACÉRATION DE VIANDE GÉLATINÉE, POUR LA CONSERVATION DES SOUCHES.

Macération de viande	1 000,0
NaCl	5,0
Gélatine	150,0

Dissoudre à chaud. Ajuster à pH 7,5 (avec NaOH N/1). Dissoudre un blanc d'œuf dans 50 cm³ H₂O et l'ajouter lentement au bouillon, à 45°. Précipiter trente minutes à 0,75 kg. Filtrer sur Chardin jusqu'à clarification absolue. Répartir en tubes étroits. Autoclaver trente minutes à 0,50 kg.

N. B. — Ensemencer après liquéfaction et conserver à +4°. (Ne pas incubé à l'étuve).

3° MILIEU SÉLECTIF GÉLOSÉ. — A 20 ml de bouillon gélosé ajouter, à 45°, 2,0 ml du mélange antiseptique décrit plus haut. Nous attirons l'attention sur la difficulté d'obtenir en milieu gélosé une concentration du mélange antiseptique aussi précise et homogène qu'en milieu liquide. Ceci limite l'emploi de ce milieu, car, pour beaucoup de streptocoques délicats, la zone sélective de concentration des antiseptiques est très étroite. Ce danger n'existe pas pour l'isolement de *Str. faecalis*. C'est pourquoi ce milieu est uniquement recommandable pour son isolement dans les selles.

B. — Prélèvements.

MÉTHODES EMPLOYÉES, SUIVANT LES CIRCONSTANCES.

a) HÉMOCULTURES. — Rappelons qu'on ne doit confier les prélèvements qu'à des opérateurs parfaitement au courant des conditions techniques indispensables.

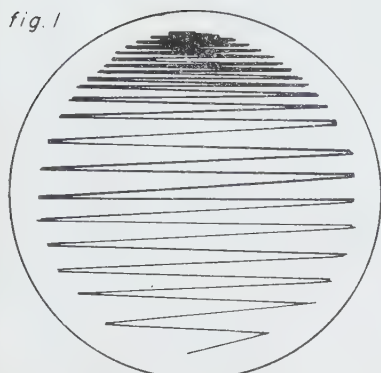
Après désinfection cutanée à l'alcool iodé, le sang est prélevé par ponction veineuse « franche », et sans traction sur le piston de la seringue ; il est injecté stérilement dans les deux compartiments d'un ballon de Gory et Jaubert contenant le bouillon E. G. T. préalablement régénéré (par vingt minutes d'ébullition) puis refroidi ; ou par adjonction de réductose ou de thioglycolate.

On injectera 10 ml de sang pour 200 ml de bouillon, proportion dont il ne faudra pas s'écarter sensiblement. La culture est ainsi réalisée, à la fois en aérobie et en anaérobie.

Rappelons également l'emploi du milieu de Reilly dont nous n'avons pas la pratique.

L'addition de pénicillinase s'impose chaque fois que le malade est soupçonné d'avoir une concentration sanguine d'antibiotique inhibitrice.

fig. 1



Étalement classique
(après une zone dense de
décharge, à partir d'une
gouttelette initiale.)

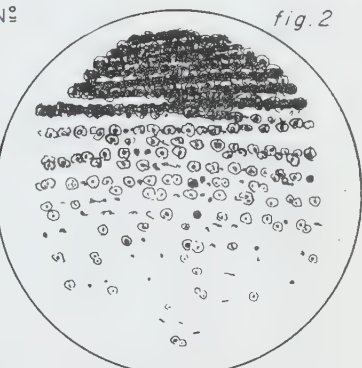
ZÔNES N°

1

2

3

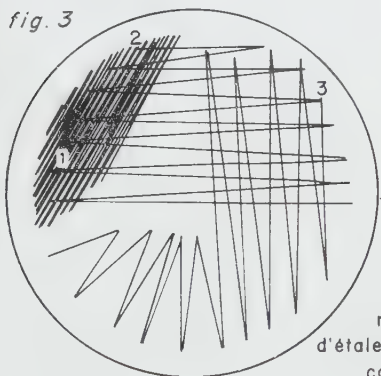
fig. 2



donnant
à titre d'exemple

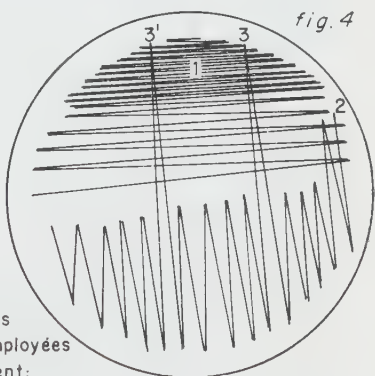
l'aspect de croissance en
3 zones schématisées.
(voir commentaires dans
le texte)

fig. 3



1 = zone dense de décharge
2 = étalement secondaire de cette
zone par des stries à 45°
3 = troisième départ de stries
— d'abord perpendiculaires aux
précédentes
— puis s'épuisant sur le 4^e quart
de la surface.

fig. 4



Autres
modalités
d'étalement
employées
couramment:

1 = zone dense de décharge suivie
d'un étalement jusqu'à mi-boîte.
Puis: 2 = 2^e départ de stries per-
pendiculaires réalisant des "rechar-
ges" en 3 et 3' et épuisement ter-
minal.

La surveillance macroscopique, et éventuellement microscopique de l'hémoculture incubée permettra, le cas échéant, de réaliser une subculture ; il faut exiger trois étalements négatifs sur gélose au sang à quatre jours d'intervalle, pour avoir le droit de dire qu'une hémoculture est négative (au streptocoque, du moins).

b) PRÉLÈVEMENTS DE GORGE (ou autres frottis). — L'écouvillon stérile qui aura servi au prélèvement est plongé dans un tube contenant 5 ou 10 ml de milieu liquide. Nous conseillons l'emploi systématique du bouillon sélectif dont nous verrons l'utilité plus loin. Contre la paroi du tube, on réalise un brassage de l'écouvillon imbibé ; puis on agite pour obtenir une répartition uniforme des bactéries dans le liquide, dont 1 goutte est déposée sur la surface d'une gélose au sang, puis étalée avec une pipette boutonnée (à préférer à l'anse de platine). Cet étalement par « épuisement » doit réaliser des stries telles qu'après dix-huit à vingt-quatre heures d'incubation à 37°, les colonies en fin d'étalement sont bien isolées, permettant ainsi de dépister les streptocoques. Pour cela les stries doivent être plus serrées au début pour décharger assez largement la pipette. Plusieurs modalités sont possibles (fig. 1, 3, 4), dont les deux dernières sont les plus recommandables.

Le bouillon sélectif dans lequel l'écouvillon a été brassé est mis à l'étuve également. Quand l'opération a été correctement effectuée, il est rare que le premier étalement présente une densité de contamination trop grande ou qu'il soit envahi par un germe mobile : dans ce cas le bouillon sélectif servira, après dix-huit heures d'incubation, à un nouveau départ.

c) SÉROSITÉS, PUS, LIQUIDES DE PONCTION (pleurale, péritonéale, céphalorachidienne, articulaire, etc.).

L'étalement sur gélose au sang sera pratiqué dans des conditions similaires, à partir du matériel pathologique, préalablement concentré par centrifugation si besoin est. Un ensemencement parallèle sera pratiqué en milieu liquide, généralement le bouillon E. V. G. sans antiseptique, car le streptocoque est le plus souvent à l'état pur.

d) LAIT. — L'isolement des streptocoques à partir de laits ordinaires, concentrés ou en poudre, nécessite souvent l'emploi de méthodes et de manipulations spéciales que nous ne traiterons pas ici. Citons les techniques employées par Seeleman [5].

e) CRACHATS. — La recherche du streptocoque dans l'expectoration nécessite, lorsque celle-ci est séromuqueuse ou muqueuse, une homogénéisation par un simple séjour de deux à trois

heures à 37°, avant de procéder à l'étalement sur gélose au sang, et à l'ensemencement parallèle en milieu sélectif.

f) MATIÈRES FÉCALES. — C'est dans ce cas seulement qu'il y a intérêt à *utiliser le milieu sélectif gélosé comme premier milieu d'isolement*, car ce milieu est appliqué à l'isolement de *Str. faecalis* comme il a été indiqué plus haut ; il est d'autant plus indiqué que les germes envahissants sont ici particulièrement fréquents. En revanche, la gélose aux antiseptiques ne permet pas la sélection des colonies, car elle en modifie les caractères (hémolyse, différenciation nette de la morphologie). Un repiquage sur gélose au sang mettra en évidence ces caractères souvent indispensables à l'isolement. Si l'on recherche également dans les selles d'autres espèces de streptocoques, il sera nécessaire de faire parallèlement des cultures suivant le procédé indiqué pour les prélèvements de gorge.

g) AIR. — La simple exposition d'une boîte de Petri ouverte pendant quelques heures permet de recueillir sur gélose au sang les germes de l'atmosphère d'une salle d'opération, d'une chambre de malade, d'un laboratoire de bactériologie, d'une salle de classe, etc. Cependant on utilise dans beaucoup de cas les techniques spéciales à la recherche des germes de l'air.

C. — Subcultures pour isolement.

Une colonie, même bien « isolée », n'est pas forcément pure, et un nouvel étalement s'impose.

Dans certains cas exceptionnels seulement, on peut se passer d'une subculture pour l'isolement d'un streptocoque, par exemple pour faire un diagnostic provisoire, en cas d'urgence ou pour vérifier la persistance d'un germe déjà isolé précédemment.

Le plus souvent, si l'étalement est bien fait, *la première culture* présente (fig. 2) trois zones : 1° une zone de culture confluyente inutilisable ; 2° une zone de colonies très serrées, mais individualisées ; 3° une zone de colonies bien séparées.

Un étalement défectueux, où manque la troisième zone, peut être néanmoins utilisé en partant de la seconde zone. On procède comme il est indiqué plus bas. Si la deuxième zone manque également, l'étalement est inutilisable.

On prélèvera les colonies qui paraissent intéressantes dans la troisième zone ; on en fera d'emblée une subculture sur gélose au sang et une autre en bouillon E. G. T. qui donneront souvent des souches pures. Mais des colonies intéressantes peuvent également *ou uniquement* se trouver dans la zone n° 2 dans laquelle il est beaucoup plus difficile de les reconnaître, la morphologie

des colonies et l'hémolyse pouvant être modifiées par la présence d'autres germes.

On ne négligera donc pas les colonies de cette zone, dès qu'on soupçonnera qu'elles peuvent être intéressantes. On rassemblera de partout le plus possible de ces colonies et on les réétera sur gélose au sang en vue d'un isolement.

De toute façon, en cas de difficultés quelconques : étalement défectueux, envahissement par un germe extensif, etc., il reste la ressource de faire un étalement à partir d'une goutte du « bouillon sélectif » qui, en général, a été ensemencé parallèlement (ensemencement parallèle qui doit être fait systématiquement pour les frottis de gorge).

Si cette culture parallèle en bouillon sélectif n'a pas été faite d'emblée, on peut encore, en partant de la culture sur gélose au sang, inutilisable directement, en réaliser une. A partir de celle-ci, un nouvel étalement sur gélose au sang permettra d'isoler le streptocoque et on se retrouvera dans les conditions de l'isolement à partir de la troisième zone, c'est-à-dire qu'on fera à ce moment une culture sur gélose au sang et une autre en bouillon E. G. T.

Les subcultures se font en déposant directement chaque prélèvement sur une gélose au sang et en l'étalant par épuisement comme pour la première culture. Pour l'étude de l'hémolyse, elles sont faites en double, en aérobie et en anaérobie.

EXAMEN DES CULTURES. — On notera : l'aspect des colonies sur gélose au sang, incubée en aérobie et éventuellement en anaérobie : taille, couleur, structure ; l'hémolyse [caractères, importance, évolution] (7) ; l'aspect en milieu liquide : culture homogène trouble, en flocons, filaments, en dépôt grumeleux, filandreux, etc.

Ces caractéristiques devront être précisées par une étude plus détaillée des colonies à la loupe binoculaire, la préparation étant éclairée par en haut, en lumière diffuse, et sous les incidences les plus favorables, avec un dispositif tel que celui qui a été décrit antérieurement [8].

Un examen microscopique après coloration au Gram complètera cette étude. On aura ainsi différencié les streptocoques des autres cocci.

D. — Identification.

On identifiera enfin l'espèce en utilisant systématiquement les réactions sérologiques auxquelles on adjoindra, dans certains cas

(7) L'étude de l'hémolyse fera l'objet d'une prochaine publication.

seulement, des réactions biochimiques choisies d'après le plan indiqué dans une précédente publication [9].

a) En vue du diagnostic sérologique, la culture permettant l'extraction des antigènes spécifiques sera faite en bouillon E. T. C. (vingt-quatre, quarante-huit heures).

b) En vue du diagnostic biochimique, on emploiera :

L'eau hyperpeptonée, additionnée de bleu de bromothymol (milieu EPB) pour l'étude de la fermentation des sucres ;

Les milieux spéciaux, étudiés dans la publication citée plus haut.

c) De nouvelles cultures sur gélose au sang seront quelquefois utiles pour confirmer la pureté d'une souche isolée, ou pour faire de nouveaux isollements, si cette pureté n'est pas confirmée par les caractères des colonies et de l'hémolyse. Nous devons signaler d'ailleurs que ces caractères, même pour une souche pure, sont parfois sujets à des variations. Nous y reviendrons dans une prochaine publication.

E. — Conservation.

Diverses méthodes peuvent être employées :

a) *Les bouillons*. Les bouillons ordinaires se prêtent à la conservation d'une souche de streptocoque, à $+4^{\circ}$ pendant huit jours en moyenne, et même moins longtemps si l'acidité du milieu et la fragilité de la souche sont grandes.

Les bouillons enrichis permettent une conservation d'un mois environ. Les pneumocoques ne se conservent guère plus de vingt-quatre heures dans ces bouillons.

b) *La macération gélatinée* (8) sera employée pour une conservation plus longue : trois mois pour les streptocoques, quinze jours au maximum pour les pneumocoques. Rappelons que les germes y sont introduits et aussitôt mis à $+4^{\circ}$ (et non pas préalablement incubés à 37°). Ce milieu doit également être employé pour l'envoi d'une souche délicate (transport de plus de dix heures).

c) *La lyophilisation*, procédé de choix, réalise les conditions optima de conservation. La pression doit descendre au moins à 0,005 mm de mercure, ce que tous les appareils ne permettent pas d'atteindre.

Lors de l'ouverture d'un coup de lime d'une ampoule lyophilisée sous vide, il faut tenir celle-ci dans l'air chaud d'un bec

(8) Un autre procédé, que nous commençons à expérimenter, paraît devoir remplacer avantageusement la conservation en milieu gélatiné ; c'est la dessiccation rapide, d'après Frobisher [3].

Bunsen pour éviter ainsi l'irruption d'air septique appelé **par le vide**.

Les cultures de dix-huit heures de streptocoques destinées à la lyophilisation sont concentrées par centrifugation et mises en suspension dans le milieu de Fry et Greaves [4] : deux volumes de sérum, un volume de bouillon, 12 p. 100 de glucose.

Pour le pneumocoque, la culture de douze à dix-huit heures en bouillon doit être lyophilisée dans le milieu même, et dès la sortie de l'étuve.

Les ampoules sont scellées sous vide.

F. — Relevé des causes d'erreur et des difficultés.

Rappelons les difficultés de culture que l'on rencontre particulièrement dans l'isolement des streptocoques. Elles sont dues :

1° *Au milieu* non approprié à cause de sa composition, de sa préparation, ou de fautes dans l'autoclavage (température excessive ou insuffisante).

2° *A la technique* de repiquage : pipette Pasteur ou anse de platine insuffisamment refroidies par exemple.

3° *A une baisse de vitalité des germes* : par exemple en cas de délai excessif entre le prélèvement et l'ensemencement, surtout en saison chaude. Dans ce cas il faut prendre certaines précautions : *ne pas transporter un écouvillon sec*, mais mettre tout de suite les germes en suspension dans du bouillon, à condition que celui-ci soit transporté dans les vingt-quatre heures en tube ou en ampoule scellé.

DISCUSSION.

Si quelques éléments de cette étude sont éprouvés de longue date et probablement connus de beaucoup de lecteurs, certains points doivent être soulignés :

Devant les difficultés de croissance toutes particulières à certaines espèces (les streptocoques des groupes sérologiques F, H et K, *Str. mitis* et *sanguis* ; les pneumocoques), il est indispensable d'employer des milieux spéciaux appropriés.

Devant d'autres échecs, il est capital de s'assurer qu'une technique correcte a été utilisée, en particulier pour la préparation des milieux, car ces préoccupations sont trop souvent reléguées à l'arrière-plan.

RÉSUMÉ.

1° Les modes de préparation des milieux de cultures pour streptocoques et pneumocoques sont indiqués. Les milieux à l'extrait de viande paraissent préférables aux macérations de viandes préparées au laboratoire.

Un milieu enrichi au lysat globulaire et un bouillon sélectif sont décrits.

2° La gélose au sang doit être préparée avec certaines précautions. En particulier l'antistreptolysine O doit être dosée dans le sang de cheval.

3° Des indications sont données pour l'ensemencement des prélèvements, en particulier en milieu contaminé, où deux ensemencements parallèles sur gélose au sang d'une part, en milieu sélectif d'autre part, sont recommandés.

4° Des techniques sont indiquées, pour les subcultures successives, d'abord pour l'isolement du germe, ensuite pour son identification, enfin pour sa conservation.

5° Quelques causes d'erreurs et difficultés sont passées en revue.

SUMMARY.

CULTURE MEDIA AND ISOLATION METHODS FOR STREPTOCOCCUS AND PNEUMOCOCCUS.

1° The preparation of culture media for Streptococcus and Pneumococcus is described. Meat extract appears to give better results than macerated meat prepared in the laboratory.

A medium enriched with erythrocyte lysate, and a selective broth formula are described.

2° Preparation of blood agar requires certain precautions, for instance titration of anti-streptolysin O must be made in horse blood.

3° Directions are given for culturing: in a contaminated medium, two parallel seedings, one on blood agar, the other on a liquid selective medium, are recommended.

4° Techniques are described for subcultures (isolation, identification and conservation of the germ).

5° Some sources of error and difficulties are reviewed.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BRYAN (C. S.). *Am. J. Publ. Health*, 1932, **22**, 749.
- [2] EDWARDS (S. J.). *J. Comp. Path. Therap.*, 1933, **46**, 211.
- [3] FROBISHER et coll. *J. Lab. and Clin. Med.*, 1947, **32**, 1008.
- [4] FRY (R. M.) et GREAVES (R.). *J. Hyg.*, 1951, **49**, 220.
- [5] SEELEMAN (H.). *Biologie der bei Tieren und Menschen vorkommenden Streptokokken*, Hans Carl, édit. Nüremberg.
- [6] STOLLERMAN (G. H.) et BERNHEIMER (A. W.). *J. Clin. Invest.*, 1950, **29**, 1147.
- [7] TODD (W.) et HEWITT (L. F.). *J. Path. Bact.*, 1932, **35**, 973.
- [8] WAHL (R.) et MANIGAULT (P.). *Bull. Microscopie appl.*, 1954, **4**, 145.
- [9] WAHL (R.) et MEYER (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 1, 147 et 279.

DOSAGE DES GROUPEMENTS THIOL PROTÉIQUES DANS DES RÉACTIONS IMMUNOCHIMIQUES

par B. ROBERT et P. GRABAR (*)

(Institut Pasteur, Service de Chimie microbienne)

On distingue souvent deux étapes dans la réaction de précipitation immunochimique : l'union antigène-anticorps et l'agréga-tion des complexes formés. De nombreux travaux portent sur le processus d'agréga-tion, mais nous avons très peu de données sur les changements de structure intramoléculaire éventuels que peut subir la molécule de l'antigène ou de l'anticorps au cours de leur interaction.

Nous nous sommes proposé d'étudier de tels changements de structure en choisissant les fonctions thiol protéiques comme indicateurs. Il est connu que le déplissement des chaînes peptidiques au cours de la dénatura-tion fait apparaître des groupements SH qui ne sont pas décelables à l'état natif.

TECHNIQUES.

Anticorps mis en œuvre : nous avons travaillé, d'une part, avec une fraction pseudoglobulinique, séparée à 33 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium, à partir d'un immun-sérum de cheval anti-sérumalbumine humaine [4] ; d'autre part, avec des fractions de pseudoglobuline et d'euglobuline, précipitées également à 30 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium à partir d'un immun-sérum de cheval anti-*Salmonella gallinarum* (1) et séparées par dialyse. Dans ce dernier cas, la plupart des anticorps anti-polyoside se trouvent dans la fraction euglobulinique.

Antigènes mis en œuvre : sérumalbumine humaine, fraction V de Cohn, de l'établissement Squibb. Polyoside de *Salmonella gallinarum*, préparé par M^{lle} A. M. Staub [6, 7].

Pour doser les groupements SH au cours des réactions immuno-chimiques, nous avons adopté le procédé suivant : une quantité donnée de l'antigène est mélangée avec l'anticorps, le

(*) Manuscrit reçu le 30 juillet 1956.

(1) L'immun-sérum et le polyoside ont été préparés et obligeamment mis à notre disposition par M^{lle} A. M. Staub [6, 7].

rapport antigène sur anticorps étant déterminé préalablement par une courbe de précipitation. Pour étudier l'influence du p-chlorobenzoate de mercure (PCMB), nous avons préparé plusieurs mélanges, contenant la même quantité de l'antigène et de l'anticorps, auxquels nous avons ajouté des quantités croissantes de PCMB. Nous avons déterminé également l'action du PCMB sur l'anticorps et sur l'antigène séparément. Des mélanges sans PCMB servaient de témoins.

Pour le dosage des groupements SH nous nous sommes servis du titrage ampérométrique selon la méthode de Kolthoff, modifiée [2] en tampon phosphate, pour le titrage par le HgCl_2 , et en tampon ammoniacal $[\text{OHNH}_4, (\text{CH}_3)_4\text{NOH}, \text{NO}_3\text{NH}_4]$ à 0,05 M de concentration finale chacun] pour le titrage par le NO_3Ag .

Après un séjour (variant de deux jours à trois semaines) à $+4^\circ\text{C}$, les mélanges entiers furent titrés (sans séparation préalable du précipité et du surnageant) en fonction du temps de conservation à $+4^\circ\text{C}$.

RÉSULTATS.

Comme nous l'avons récemment signalé [3], les globulines étudiées par nous n'ont pas de groupement SH titrable à l'état natif. La dénaturation par l'urée, la guanidine ou la soude font apparaître de 5 à 10 Mols SH pour 10^5 g de globuline.

Dans les réactions immunochimiques, comme en témoignent les tableaux ci-joints, on constate également, d'une façon constante, l'apparition de faibles quantités de groupements SH. Les tableaux I et II montrent les résultats obtenus pour les systèmes pseudoglobuline anti-sérumalbumine humaine + sérumalbumine humaine (que nous désignons par PS anti-SAH + SAH), pseudoglobuline antipolyoside *Salmonella gallinarum* + polyoside de *Salmonella gallinarum* (PS anti-pSG + pSG) et euglobuline antipolyoside *Salmonella gallinarum* + polyoside *Salmonella gallinarum* (EU anti-pSG + pSG).

En ajoutant le PCMB au mélange antigène-anticorps, nous voulions bloquer les groupements SH qui pouvaient apparaître au cours de la réaction immunochimique.

D'autre part, nous avons signalé récemment, qu'au cours de l'incubation avec le PCMB, la teneur en SH titrable au Hg^{++} du sérum et des globulines augmente [5].

Nous avons donc effectué des titrages sur les mélanges antigène-anticorps, antigène-anticorps + PCMB et anticorps + PCMB. (La sérumalbumine ne libère pas de SH en présence de PCMB et le polyoside n'en contient pas.) Le tableau II montre qu'à une seule exception près (système II après cinq jours), la libération

TABLEAU I.

N°	Composition du mélange	Quantité des constituants	Volume total	Titre après séjour à + 4° C (en jours)	M Hg ⁺⁺ fixé 10 ⁵ g glob.
I.	<u>Pseudo,lobuline de cheval antipolyoside salm. gall (PS anti p SG).</u>				
1.	PS anti p SG + p SG + PCMB	86,5 mg 0,1 mg 0,4 µM	10 ml	5 20	0,127 0,127
2.	PS anti p SG + PCMB	86,5 mg 0,4 µM	10 ml	5 20	0,127 0,124
3.	PS anti p SG + p SG	86,5 mg 0,1 mg	10 ml	5 20	0 0,049
II.	<u>Euglobuline de cheval antipolyoside salm. gall (EU anti p SG).</u>				
4.	EU anti p SG + p SG + PCMB	43,6 mg 0,5 mg 0,8 µM	2,5 ml	5 15	0,132 0,258
5.	EU anti p SG + PCMB	43,6 mg 0,8 µM	2,5 ml	5 15	0,099 0,183
6.	EU anti p SG + p SG	43,6 mg 0,5 mg	2,5 ml	5 15	0 0,120
III.	<u>Pseudoglobuline de cheval anti serumalbumine humaine (PS anti SAH).</u>				
7.	PS anti SAH + SAH + PCMB	115 mg 3,72mg 4 µM	10 ml	9 16	0,087 0,151
8.	PS anti SAH + PCMB	115 mg 4 µM	10 ml	9 16	0,039 0,061
9.	PS anti SAH + SAH	115 mg 3,72mg	10 ml	9 16	0,069 0,061

d'SH dans la réaction immuno-chimique est la même, ou plus faible en présence de PCMB qu'en son absence. La troisième colonne de ce tableau est obtenue en déduisant la quantité de SH libérée dans le mélange anticorps + PCMB de celle du mélange antigène-anticorps + PCMB en admettant que le PCMB agit sur l'anticorps de la même façon que sur le précipité spécifique.

La spécificité de la méthode de titrage est prouvée par l'expérience suivante : la teneur en SH d'un mélange PS anti-SAH — SAH, contenant des quantités croissantes de PCMB est déterminée par des titrages ampérométriques à l'Ag⁺ et au Hg⁺⁺. La figure 1 montre que la consommation du Hg⁺⁺ augmente avec la concentration en PCMB, tandis que celle de l'Ag⁺ diminue. Ingram [4] a montré que le Hg⁺⁺ déplace le PCMB de sa liaison avec les SH, mais non l'Ag⁺. Nos résultats sont conformes à ces faits et montrent ainsi qu'il s'agit bien, dans nos expériences, de groupements SH. Cette épreuve est l'une des

TABLEAU II.

N°	Séjour à + 4° C (en jours)	Libération de SH avec PCMB*	N/10 ⁵ g. glob. sans PCMB**
I	5 20	0,003	0,049
II	5 15	0,033 0,075	0 0,12
III	9 16	0,029 0,035	0,250 0,042

* Les chiffres de la troisième colonne sont obtenus en déduisant les valeurs pour anticorps + PCMB de celles anticorps + antigène + PCMB.

** Les chiffres de la quatrième colonne sont les valeurs pour anticorps + antigène sans PCMB.

Les chiffres correspondant à la III^e série ont été corrigés pour la quantité de SH titrable dans la sérumalbumine initiale.

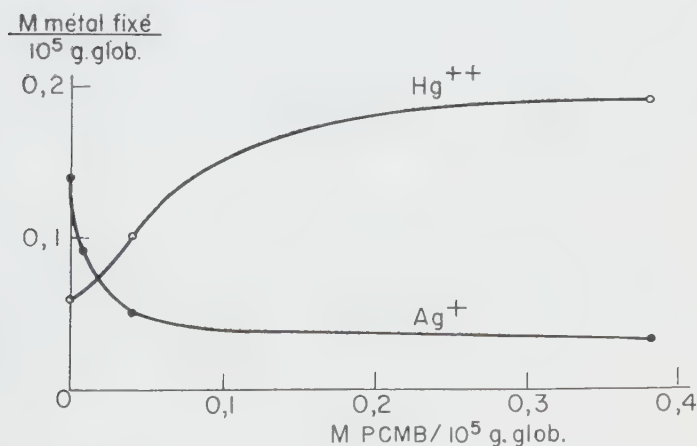


FIG. 1.

plus spécifiques dont nous disposons pour la caractérisation des groupements SH.

DISCUSSION.

La libération d'une faible quantité de groupements SH de l'anticorps au cours des réactions immunochimiques étudiées est

probablement liée à la transformation lente et irréversible que subit le complexe antigène-anticorps précipité et qui se traduit par la diminution de la solubilité de ce complexe en excès d'antigène, après une période assez longue.

Les groupements SH apparaissant dans la réaction appartiennent sans doute à l'anticorps, car dans l'un des systèmes utilisés, l'antigène (haptène) de nature polyosidique est dépourvu de groupements SH ; dans l'autre système, la sérumalbumine ne libère pas de groupements SH ni en contact avec le PCMB, ni par une dénaturation ménagée : il est donc peu probable qu'elle en libère dans la réaction antigène-anticorps.

La valeur faible des fonctions thiol trouvée peut être due à ce qu'une partie seulement des molécules d'anticorps subit des modifications profondes, ou à une réversibilité partielle de ces transformations.

Vu la régularité avec laquelle nous avons constaté l'augmentation des groupements thiol titrables au cours d'un grand nombre d'expériences, et l'absence de toute augmentation dans les témoins, nous pensons que nos résultats sont significatifs.

Avant de pouvoir discuter en détail ces hypothèses, nous préférons étendre ces études sur d'autres systèmes immunochimiques. Toutefois, il semble certain que la libération des groupements SH constatée témoigne des changements intramoléculaires lents des anticorps, accompagnant les réactions intermoléculaires.

RÉSUMÉ.

Une libération faible, mais significative de groupements thiol a été mise en évidence au cours des réactions de précipitations spécifiques. Cette libération traduit probablement des remaniements de la structure de l'anticorps au cours de la réaction.

SUMMARY.

DETERMINATION OF THE THIOL-PROTEIN GROUPS IN IMMUNOCHEMICAL REACTIONS.

The authors investigated the SH group of some immuno-precipitating systems. They found a slow but significant liberation of previously unreactive globulin SH groups in all the systems investigated. This liberation of SH group seems to be independent of the PCMB induced liberation of unreactive thiol groups of blood serum and to a lesser degree of some globulin fractions.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BURTIN (P.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1954, **36**, 335 ; 1955, **37**, 977.
- [2] ROBERT (B.) et ROBERT (L.). *Ann. Biol. Clin.*, 1956, **14**, 587.
- [3] ROBERT (B.) et GRABAR (P.). *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **242**, 1369.
- [4] INGRAM (U. M.). *Biochem. J.*, 1955, **59**, 653.
- [5] ROBERT (B.) et ROBERT (L.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1957 (*sous presse*) et IV^e Colloque de l'Hôpital Saint-Jean de Bruges (*sous presse*).
- [6] DAVARPANAH (C.). *Thèse de sciences*, Paris, 1956.
- [7] STAUB (A. M.) et DAVARPANAH (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 338.

ÉTUDE DE LA DÉGRADATION DE LA SÉRUMALBUMINE HUMAINE PAR UN EXTRAIT DE RATE DE LAPIN.

III. MODIFICATIONS IMMUNOLOGIQUES DE L'ALBUMINE EN FONCTION DU STADE DE DÉGRADATION.

par Claude LAPRESLE (*) et Janine DURIEUX (**)

(Institut Pasteur, Service de Chimie Microbienne)

L'un de nous, dans une étude antérieure consacrée à la dégradation d'un antigène protéique par les enzymes cellulaires de l'organisme, a précisé le mode d'action des protéases de la rate du lapin [5] et montré qu'au cours de la dégradation de l'albumine par ces enzymes, son motif antigénique est scindé en trois groupements spécifiques distincts auxquels correspondent dans le sérum de lapin anti-albumine trois anticorps différents [6].

Le but du présent travail est d'étudier l'ensemble des modifications immunologiques de l'albumine au cours de sa dégradation dans ces conditions et de rapporter la scission de son motif antigénique à une modification chimique aisément reproductible.

Nous avons donc suivi comparativement, au point de vue chimique et immunologique, la dégradation en un temps donné d'une quantité constante de sérumalbumine humaine par des quantités croissantes d'extrait de rate de lapin.

MATÉRIEL.

Nous avons utilisé une albumine humaine préparée par la méthode de Cohn (fraction V) et lyophilisée.

Nous avons précipité l'extrait de rate de lapin (1) par le sulfate d'ammonium à 50 p. 100, concentration qui permet d'éliminer de la préparation enzymatique l'albumine de lapin, tout en précipitant la majeure partie de son activité protéolytique. A une partie d'extrait brut préparée comme précédemment [5], est ajoutée une quantité égale de sulfate d'ammonium saturé et neutralisé. Après une heure

(*) Attaché de Recherches à l'Institut National d'Hygiène.

(**) Manuscrit reçu le 19 juillet 1956.

(1) Nous remercions M^{me} Kolochine-Erber qui nous a procuré les rates de lapins normaux.

à la température de la pièce, le précipité est centrifugé, remis en suspension et dialysé à $+4^{\circ}$ contre de la solution physiologique jusqu'à élimination complète du sulfate d'ammonium. Au cours de la dialyse, il se forme un précipité que l'on élimine par centrifugation. Le surnageant est congelé et conservé à -20° . La teneur en azote de l'extrait ainsi préparé est déterminée par micro Kjeldahl et sa teneur en protéine calculée en multipliant le taux d'azote par 6,25.

Nous avons utilisé sous le nom de sérum anti-albumine un mélange de 6 sérums de lapins immunisés comme précédemment [6].

MÉTHODES.

Nous avons suivi la dégradation enzymatique en mesurant comme précédemment [5], avec le réactif du biuret, le pourcentage d'albumine non précipité par l'acide trichloracétique à 5 p. 100. Une série de tubes est préparée avec dans chaque tube 0,25 ml de solution d'albumine à 4 p. 100, 0,25 ml de solution d'extrait enzymatique de concentration croissante et 1 goutte de chloroforme. Sont préparés simultanément : un tube avec 0,25 ml de solution d'extrait enzymatique à la concentration maximum utilisée et 0,25 ml de solution physiologique, un tube avec 0,25 ml de solution d'albumine et 0,25 ml de solution physiologique, un blanc avec 0,5 ml de solution physiologique. Tous les tubes sont faits en duplicata. A la fin de la réaction les milieux ainsi constitués sont précipités par l'acide trichloracétique et les précipités traités par le réactif du biuret comme précédemment [5]. La coloration obtenue avec chaque tube est lue au colorimètre photo-électrique de l'Electro-Synthèse (écran vert jaune) contre le blanc de solution physiologique. La densité optique fournie par le tube contenant l'extrait enzymatique sans albumine est soustraite de celle fournie par le tube contenant l'albumine et la même concentration maximum d'extrait enzymatique. Pour les concentrations intermédiaires d'extrait enzymatique, la valeur à soustraire est calculée par intrapolation. Le pourcentage d'albumine non précipité par l'acide trichloracétique à 5 p. 100, pour chaque concentration d'extrait enzymatique, est calculé par rapport au tube contenant l'albumine sans extrait enzymatique.

Pour les expériences immunologiques la dégradation a été conduite dans les mêmes conditions, mais avec un plus grand volume (3 ml) de milieu en réaction. A la fin de la dégradation les milieux en réaction ont été clarifiés par centrifugation, neutralisés par addition d'une goutte de soude de concentration convenable et conservés, jusqu'à leur utilisation, congelés à -20° .

La précipitation spécifique pour l'étude des surnageants a été faite avec 0,2 ml de sérum anti-albumine. Les précipités ont été centrifugés après vingt-quatre heures à la glacière et les surnageants ont été testés avec une quantité constante de sérum anti-albumine et des dilutions identiques des échantillons d'albumine (0,2 mg par millilitre).

La précipitation spécifique quantitative a été faite avec 0,4 ml de sérum anti-albumine. Les précipités ont été centrifugés après quarante-huit heures à la glacière, lavés deux fois à $+4^{\circ}$ avec la solution physiologique et le taux d'azote déterminé par micro Kjeldahl.

L'immuno-électrophorèse [2] a été faite dans les conditions sui-

vantes : quantité de liquide à analyser : environ 0,06 ml ; tampon véronal pH : 8,2 et force ionique, 0,05 dans les bacs et 0,025 dans la gélose ; V/cm, 5 ; durée, quatre heures ; quantité de sérum anti-albumine, 2 ml.

Toutes les réactions immunologiques ont été faites en présence de merthiolate de soude au 1/10 000.

MODE OPÉRATOIRE.

La dégradation a été conduite dans les conditions suivantes : concentration de l'albumine, 20 mg par millilitre de milieu en réaction ; pH, 3,5 ; température, 45° ; temps de dégradation, vingt heures.

Nous avons amené le milieu en réaction au pH voulu par addition d'HCl. Le pouvoir tampon de l'albumine est en effet suffisant pour que le pH ne change au cours de la dégradation que de 1 à 2/10 d'unité vers l'alcalinité. Dans ces conditions, comme l'ont montré des expériences préliminaires, le pH optimum de la réaction est de 3.5 et la température optimum de 45°.

Dans toutes les expériences un témoin a été fait avec un tube contenant l'albumine et, à la concentration maximum utilisée, l'extrait enzymatique inactivé par chauffage à 80° pendant trente minutes. Les résultats obtenus ont été les mêmes qu'avec le tube contenant l'albumine sans extrait enzymatique.

Toutes les expériences ont été faites en solution physiologique de NaCl à 8,5 p. 1 000, concentration saline optimum pour les réactions immunologiques.

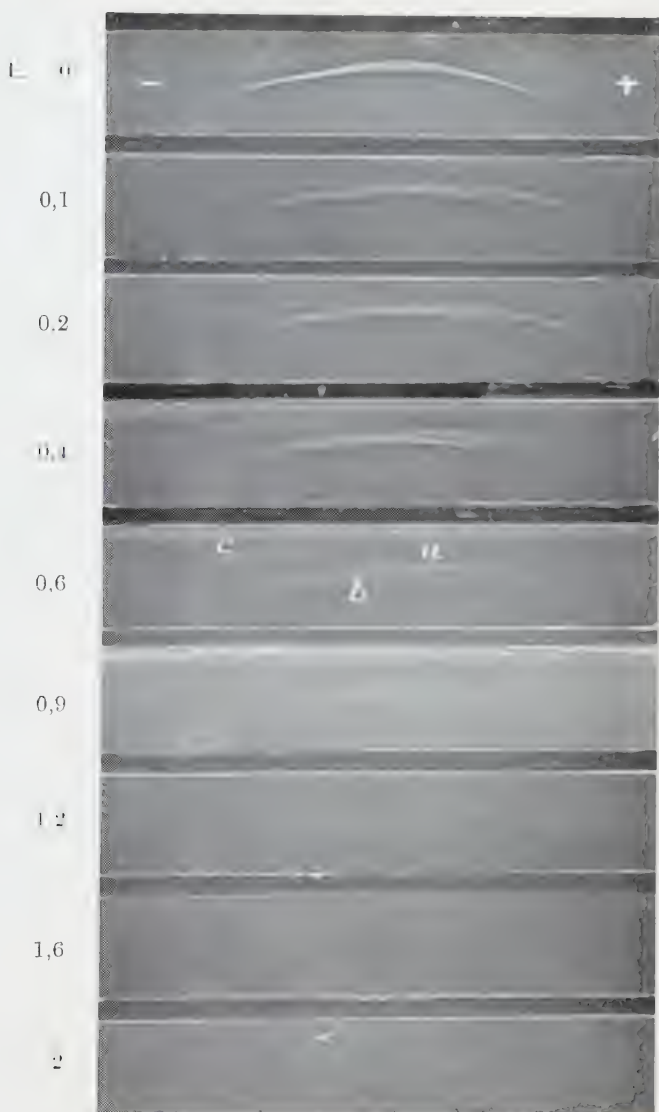
Les dégradations ont été conduites avec la même préparation enzymatique et simultanément pour les expériences chimiques et immunologiques. Les échantillons successifs d'albumine dégradée sont désignés par la quantité d'extrait enzymatique utilisée pour la dégradation.

RÉSULTATS.

1° *Mesure de la dégradation enzymatique.* — L'activité enzymatique des protéases de la rate de lapin se traduisant par la rupture d'un petit nombre de liaisons peptidiques et une diminution comparativement beaucoup plus importante de la précipitabilité par l'acide trichloracétique [5], c'est ce deuxième critère que nous avons choisi pour mesurer la dégradation de l'albumine.

Pour réduire le plus possible le temps de la réaction, nous avons étudié celle-ci avec des concentrations maximum d'extrait enzymatique relativement élevées par rapport à celle du substrat (10 p. 100). Ce fait est en effet sans inconvénient du point de vue chimique, puisque le réactif du biuret donne avec l'extrait enzymatique seul des valeurs très faibles et du point de vue immunologique, puisque les protéines de l'extrait enzymatique ne réagissent pas avec le sérum de lapin anti-albumine.

Les modifications immunologiques qui nous intéressent étant



Immunoélectrophorèse des échantillons successifs d'albumine dégradée. E : quantité d'extrait enzymatique, en milligrammes de protéine par millilitre de milieu en réaction, utilisée pour la dégradation de l'albumine.

fonction de la dégradation du substrat et non de la quantité, en valeur absolue, des produits de dégradation formés, nous avons exprimé nos résultats en pourcentage et non en quantité d'albumine non précipitée par l'acide trichloracétique à 5 p. 100. Ces deux notations ont la même signification du point de vue enzy-

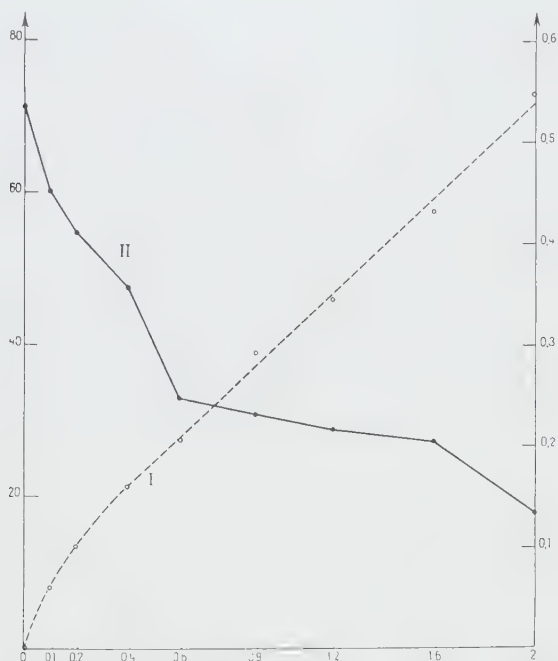


FIG. 1. — Abscisse : extrait enzymatique en milligrammes de protéine par millilitre de milieu en réaction. — Courbe I (ordonnée à gauche) : pour 100 d'albumine non précipité par l'acide trichloracétique à 5 p. 100. — Courbe II (ordonnée à droite) : milligrammes d'azote précipités par millilitre de sérum anti-albumine avec les échantillons successifs d'albumine dégradée à la limite de leurs zones respectives d'excès d'anticorps.

matique puisque la concentration du substrat dans le milieu en réaction a été gardée constante.

La courbe I de la figure 1 montre les résultats obtenus après dégradation de l'albumine par des quantités croissantes d'extrait enzymatique.

En changeant convenablement chaque fois l'échelle des abscisses, la courbe I est reproductible avec n'importe quel extrait enzymatique préparé dans les mêmes conditions. Elle permet

donc, dans les limites expérimentales étudiées, de déterminer empiriquement la quantité d'un extrait enzymatique inconnu nécessaire pour conduire à un stade donné la dégradation de l'albumine.

2° *Etude des surnageants obtenus après précipitation spécifique du sérum anti-albumine par les échantillons successifs d'albumine dégradée.* — Nous avons étudié les surnageants des courbes de précipitation spécifique obtenues en ajoutant à une quantité constante de sérum anti-albumine des quantités croissantes de chacun des échantillons successifs d'albumine dégradée. Ces surnageants ont été testés par l'épreuve du disque (ring-test) avec le sérum anti-albumine, pour déterminer les zones d'excès d'antigène et pour déterminer les zones d'excès d'anticorps avec l'échantillon d'albumine dégradée utilisée pour la précipitation spécifique et avec l'albumine non dégradée. Les résultats de cette étude, rassemblés dans le tableau I, montrent les faits suivants :

TABLEAU I. — Etude des surnageants des courbes de précipitation spécifique obtenues en ajoutant à des quantités constantes de sérum de lapin anti-albumine des quantités croissantes de chaque échantillon successif d'albumine dégradée.

E \ A	0,05	0,15	0,25	0,5	0,75	1	1,25	1,5	2	2,5	3	4	5	6	8	10
0			+		+											
0,1		+		+												
0,2	+				+											
0,4	+					+	+									
0,6		+				+		+								
0,9		+				+					+					
1,2	1	+					+	II					+	III		
1,6		+				+								+		
2		+			+										+	

E : quantité d'extrait enzymatique, en milligrammes de protéine par millilitre de milieu en réaction, utilisée pour la dégradation de l'albumine. A : milligrammes d'albumine ajoutés par millilitre de sérum anti-albumine pour la précipitation spécifique. — *Ligne I.* Limite des zones d'excès d'antigène. — *Ligne II.* Limite des zones d'excès d'anticorps lorsque les surnageants sont testés avec l'échantillon d'albumine dégradée utilisée pour la précipitation spécifique. — *Ligne III.* Limite des zones d'excès d'anticorps lorsque les surnageants sont testés avec l'albumine non dégradée.

a) Il existe pour une certaine quantité d'albumine non dégradée (0,5 mg par millilitre d'immunsérum) une zone d'équivalence où les surnageants ne réagissent ni avec l'antigène, ni avec l'anti-

corps. Dès le début de la dégradation, du fait du croisement des zones d'excès d'antigène (2) et d'anticorps, cette zone d'équivalence disparaît, remplacée par une zone intermédiaire où les surnageants réagissent à la fois avec l'antigène et avec l'anticorps. Ce fait montre que le motif antigénique de l'albumine a été scindé de telle façon que le système précipitant simple, formé par l'albumine et le sérum anti-albumine, a été transformé en un système précipitant complexe de plus d'un antigène et d'un anticorps. Rappelons que l'analyse en milieu gélifié des surnageants obtenus dans des conditions analogues avait effectivement permis à l'un de nous de mettre en évidence trois antigènes et trois anticorps différents [6]. On remarquera, par ailleurs, que les déplacements en sens inverse des zones d'excès d'antigène et d'anticorps n'ont pas exactement la même signification. Le déplacement vers la gauche, c'est-à-dire vers l'excès d'anticorps, de la limite des zones d'excès d'antigène (ligne I), ne peut s'expliquer que par la scission du motif antigénique et la formation ainsi d'un antigène ne précipitant qu'une partie seulement des anticorps précipités par l'albumine non dégradée. Le déplacement vers la droite, c'est-à-dire vers l'excès d'antigène, des limites des zones d'excès d'anticorps, est lié à la scission du motif antigénique mais éventuellement aussi à un appauvrissement en antigène de l'albumine dégradée.

b) Lorsque les surnageants sont testés avec l'albumine non dégradée, la limite des zones d'excès d'anticorps (ligne III) se déplace constamment vers la droite. Lorsque les surnageants sont testés avec l'échantillon d'albumine dégradée utilisée pour la précipitation spécifique, la limite des zones d'excès d'anticorps (ligne II) se déplace initialement vers la droite mais revient ensuite progressivement vers la gauche. Les deux limites des zones d'excès d'anticorps qui coïncident au début s'éloignent donc ensuite de plus en plus. L'albumine dégradée ne précipite plus alors avec un nombre de plus en plus grand de surnageants contenant cependant des anticorps non saturés puisqu'ils précipitent avec l'albumine non dégradée.

Ce comportement différent des deux limites des zones d'excès d'anticorps traduit la diminution du pouvoir précipitant de l'albumine dégradée. En effet, le déplacement vers la droite de la ligne III montre que, lorsque des quantités croissantes de chacun des échantillons successifs d'albumine dégradée sont ajoutées à une quantité constante de sérum anti-albumine, il faut une quantité

(2) Bien que leur antigénicité proprement dite n'ait pas encore été étudiée, le terme d'antigène est utilisé par commodité dans ce travail pour désigner les produits de dégradation de l'albumine qui réagissent spécifiquement avec le sérum anti-albumine.

de plus en plus grande d'albumine dégradée pour saturer les anticorps anti-albumine. Par contre, lorsque les surnageants ainsi obtenus sont testés avec une quantité constante de chacun des échantillons successifs d'albumine dégradée, l'éloignement vers la gauche de la ligne II montre que la précipitation ne s'observe que si ces surnageants contiennent une quantité de plus en plus grande d'anticorps non saturés. En d'autres termes, alors que la saturation des anticorps anti-albumine par l'albumine dégradée nécessite un rapport albumine dégradée/anticorps de plus en plus élevé, leur précipitation ne s'observe que pour un rapport albumine dégradée/anticorps de moins en moins élevé. Ce fait ne peut s'expliquer que par la transformation des antigènes précipitants de l'albumine dégradée en antigènes de moins en moins précipitants, se combinant avec les anticorps anti-albumine, mais ne précipitant avec eux que pour des concentrations d'anticorps par rapport à l'antigène de plus en plus élevées.

Cette étude des surnageants permet donc de dissocier les deux conséquences immunologiques essentielles de la dégradation de l'albumine : la scission du motif antigénique de l'albumine et la formation d'antigènes non précipitants. Elle montre également que la limite des zones d'excès d'anticorps, lorsque les surnageants sont testés avec l'albumine dégradée (ligne II), est la plus intéressante à étudier puisqu'elle se déplace dans deux sens différents sous l'influence successivement de ces deux facteurs.

3° *Précipitation spécifique quantitative du sérum anti-albumine par les échantillons successifs d'albumine dégradée à la limite de leur zone respective d'excès d'anticorps.* — L'azote du précipité spécifique formé par l'albumine et le sérum de lapin anti-albumine, au point d'équivalence où tous les anticorps sont précipités, est constitué essentiellement par l'azote de l'anticorps puisque le rapport N de l'antigène/N de l'anticorps est alors environ de 1/6. Par conséquent, la quantité d'azote précipitée par les échantillons successifs d'albumine dégradée à la limite de leurs zones respectives d'excès d'anticorps (ligne II) où théoriquement tous les anticorps sont précipités devrait changer très peu. En réalité, elle diminue de façon importante parce que la totalité des anticorps n'est pas précipitée du fait : a) de la scission du motif antigénique de l'albumine qui transforme le système précipitant simple formé par l'albumine non dégradée en un mélange de systèmes précipitants différents n'ayant pas les mêmes points d'équivalence, et b) de la formation d'antigènes non précipitants se combinant, sans les précipiter avec une partie des anticorps anti-albumine. La mesure, par conséquent, de l'azote précipité par les échantillons successifs d'albumine dégradée à la limite de leurs zones d'excès d'anticorps (ligne II) fournit un moyen quantitatif indirect de

suivre ces deux modifications immunologiques de l'albumine au cours de sa dégradation.

Nous avons donc dosé la quantité d'azote précipitée par chaque échantillon d'albumine ajouté au sérum anti-albumine en quantité juste suffisante pour que les surnageants ne réagissent plus avec l'échantillon utilisé pour la précipitation spécifique, c'est-à-dire la quantité de chaque échantillon d'albumine dégradée la plus voisine à droite de la ligne II du tableau I. La courbe II (fig. 1) montre les résultats de cette étude.

On voit que cette courbe présente trois parties. Dans une première partie, la quantité d'azote du précipité spécifique diminue rapidement jusqu'à 50 p. 100 environ de sa valeur initiale. A ce stade très peu d'antigènes non précipitants sont formés, comme le montre la proximité des lignes II et III du tableau I. La diminution du précipité spécifique ne peut donc être due qu'à la scission du motif antigénique de l'albumine et à la formation ainsi de systèmes précipitants différents. Les précipités dosés correspondent de ce fait à la zone d'équivalence du système le plus riche en anticorps et à la zone d'excès d'antigène des autres systèmes.

La deuxième partie de la courbe est presque horizontale. A ce stade, la formation d'antigènes non précipitants n'est plus négligeable, comme le montre l'éloignement des courbes II et III du tableau I. Ce plateau montre donc que la scission du motif antigénique est achevée pour la totalité des molécules d'albumine et confirme que la diminution du précipité spécifique dans la première partie de la courbe ne pouvait être due à la petite quantité d'antigènes non précipitants formés.

Dans la troisième partie de la courbe le précipité diminue à nouveau. Cette diminution ne peut plus être due qu'à la formation en quantité de plus en plus importante, comme le montre le déplacement vers la gauche de la ligne II (tableau I), d'antigènes non précipitants, qui n'influent donc que tardivement sur la quantité de précipité obtenu dans ces conditions.

On voit ainsi que le point d'inflexion entre la première et la deuxième partie de la courbe II correspond au stade où la scission du motif antigénique de toutes les molécules d'albumine est achevée, c'est-à-dire à un stade déterminé de dégradation de l'albumine. Ce point d'inflexion correspondra donc toujours à ce stade de dégradation, quel que soit l'immunsérum utilisé, à condition que celui-ci contienne les différents anticorps précipitant indépendamment avec les produits de dégradation de l'albumine. Nous n'avons pas recherché si, en général, tout sérum anti-albumine contient ces différents anticorps, mais ce fait est de toute façon aisément réalisé en utilisant, comme nous l'avons fait, des mélanges de sérums provenant de lapins différents.

Dans ces conditions, si la position du point d'inflexion de la courbe II par rapport à l'axe des ordonnées dépend de la richesse en anticorps de l'immunsérum utilisé, sa position par rapport à l'axe des abscisses est indépendante de cet immunsérum et correspond à la quantité d'extrait enzymatique ayant dégradé l'albumine jusqu'à ce que la scission du motif antigénique de toutes les molécules soit achevée. On peut alors en déduire en se reportant à la courbe I, pour quel pourcentage, en général, d'albumine non précipitée par l'acide trichloracétique à 5 p. 100, la scission du motif antigénique de l'albumine est achevée.

Dans l'expérience reproduite figure 1, ce pourcentage est de 25 p. 100. Une autre expérience faite avec un sérum anti-albumine nettement plus riche en anticorps, obtenu en mélangeant les mêmes sérums en proportions différentes, nous avait donné 30 p. 100. Cette détermination peut donc être faite avec une approximation satisfaisante.

4° *Immunoélectrophorèse des échantillons successifs d'albumine dégradée.* — Si les méthodes précédentes permettent de mettre en évidence, au cours de la dégradation de l'albumine, la scission de son motif antigénique, seules les méthodes de précipitation spécifique en milieu gélifié permettent le dénombrement des systèmes précipitants formés dans ces conditions. Nous avons donc suivi simultanément la dégradation de l'albumine par l'immunoélectrophorèse. Les résultats obtenus figurent sur la planche.

On voit, comme nous l'avons montré antérieurement [6], que la ligne formée par l'albumine est remplacée par trois lignes indépendantes l'une de l'autre, correspondant à des mobilités électrophorétiques différentes et dénommées *a b c* de la plus rapide à la plus lente. L'apparition de *b* est presque immédiate mais la séparation de *a* et *c* n'est achevée que pour une quantité d'extrait enzymatique (0,6 mg) correspondant au point d'inflexion de la courbe II. Ainsi se trouve confirmée la signification que nous avons donnée à cette inflexion.

Ultérieurement les trois lignes *a b c* s'effacent progressivement du fait de la transformation en antigènes non précipitant des produits de dégradation de l'albumine. Il semble donc bien, comme le suggéraient déjà nos expériences antérieures [6], qu'il ne se forme pas, au cours de la dégradation de l'albumine, d'autres produits de dégradation que *a b c*, précipitants avec le sérum anti-albumine.

DISCUSSION.

Les résultats que nous venons d'exposer montrent que les trois antigènes précipitants *a b c*, formés au cours de la dégradation de la sérumalbumine humaine par les protéases de la rate du

lapin, sont secondairement transformés en antigènes se combinant avec les anticorps anti-albumine, mais ne précipitant avec eux que pour des concentrations d'anticorps par rapport à l'antigène de plus en plus élevées.

Cette formation d'antigènes non précipitants a déjà été observée au cours de l'hydrolyse pepsique par Holiday [3], et par Kleczkowski [4] et les propriétés immunologiques des produits de dégradation étudiés par ce dernier (précipitation pour des concentrations élevées d'anticorps et déplacement vers la zone d'excès d'anticorps de la courbe de précipitation spécifique) sont tout à fait semblables à celles que nous avons constatées. Ce fait, cependant, n'a pas la même signification physiologique au cours de l'hydrolyse pepsique qu'au cours de la dégradation par une préparation de protéases endocellulaires. Plus intéressante à cet égard est la mise en évidence, récemment, par Garvey et Campbell, chez l'animal immunisé, de produits de dégradation de l'antigène ne précipitant pas mais inhibant la précipitation spécifique de l'antigène initial [4].

Le but essentiel de ce travail était d'étudier les modifications immunologiques de l'albumine en fonction de son stade de dégradation et en particulier de déterminer le stade où la scission du motif antigénique responsable de la précipitation spécifique de l'albumine est achevée. Des différents stades de dégradation de l'albumine, celui-ci est, en effet, l'un des plus intéressants parce qu'il correspond à la disparition complète de l'antigène initial et permet d'étudier facilement les trois antigènes précipitants *a b c*, encore peu transformés en antigènes non précipitants.

Nos résultats montrent que cette étude est effectivement possible grâce aux répercussions différentes des modifications immunologiques de l'albumine sur le comportement du système précipitant qu'elle forme avec le sérum anti-albumine.

C'est ainsi que, dans l'étude des surnageants des courbes de précipitation spécifique formées par les échantillons successifs d'albumine dégradée (tableau I), le déplacement initial vers l'excès d'antigène de la limite des zones d'excès d'anticorps (ligne II) montre que la scission du motif antigénique correspond au début de la dégradation, tandis que son déplacement secondaire vers l'excès d'anticorps montre que la transformation des antigènes précipitants en antigènes non précipitants correspond à des stades ultérieurs de la dégradation. L'étude comparative, cependant, de la ligne II et de la ligne III montre que la formation d'antigènes non précipitants commence avant que la scission du motif antigénique soit achevée. De ce fait, la ligne II, soumise à ces deux influences contradictoires, ne présente pas, pendant plusieurs stades de dégradation, de déplacement significatif et la

détermination du stade où la scission du motif antigénique est achevée reste imprécise.

Cette détermination, par contre, peut être faite avec précision par l'étude de la courbe obtenue en dosant l'azote précipité par les échantillons successifs d'albumine dégradée à la limite de leurs zones respectives d'excès d'anticorps (courbe II, fig. 1). En effet, la scission du motif antigénique entraîne une diminution brutale du précipité spécifique obtenu dans ces conditions alors que la formation d'antigènes non précipitants n'entraîne qu'une diminution moins importante et beaucoup plus tardive de ce précipité. De ce fait le changement de la pente de cette courbe, qui correspond au stade où la scission du motif antigénique est achevée pour la totalité des molécules d'albumine, se traduit par un point d'inflexion facile à déterminer et qui, étant indépendant de l'immunsérum utilisé, peut être rapporté à une modification chimique aisément reproductible.

Du point de vue enzymatique enfin, nos résultats montrent l'intérêt de l'emploi des méthodes immunochimiques dans l'étude de la protéolyse. Elles permettent, en effet, d'identifier certains produits initiaux de la dégradation protéique et de mettre en évidence la dégradation complète du substrat à un stade où les méthodes classiquement utilisées dans ce domaine, mesure de la précipitabilité trichloracétique et plus encore de la rupture peptidique [5], pourraient laisser penser qu'une partie importante du substrat n'a pas été attaquée.

CONCLUSIONS.

1° La dégradation, pendant vingt heures, à pH 3,5 et 45°, de la sérumalbumine humaine par un extrait de rate de lapin a été mesurée par la détermination du pourcentage d'albumine non précipitée par l'acide trichloracétique à 5 p. 100 et les conditions de reproductibilité de la réaction ont été définies.

2° L'étude des modifications immunologiques de l'albumine en fonction du stade de dégradation montre que les trois antigènes précipitants *a*, *b*, *c*, formés à la suite de la scission initiale du motif antigénique de l'albumine, sont transformés secondairement en antigènes non précipitants.

3° L'étude du précipité spécifique formé par le sérum anti-albumine et les échantillons successifs d'albumine dégradée à la limite de leurs zones respectives d'excès d'anticorps permet de déterminer, indépendamment de l'immunsérum utilisé, le stade pour lequel la scission du motif antigénique de l'albumine est achevée, et de le rapporter à un stade déterminé de dégradation de l'albumine.

Nous tenons à exprimer notre reconnaissance à M. P. Grabar pour les encouragements et les précieux conseils que nous avons reçus de lui au cours de ce travail.

Nous remercions M. M. Challeil pour son aide technique.

SUMMARY.

STUDIES ON THE HUMAN SERUMALBUMIN DEGRADATION BY AN EXTRACT OF RABBIT SPLEEN.

III. RELATIONSHIPS BETWEEN IMMUNOLOGICAL MODIFICATION OF ALBUMIN AND STAGE OF DEGRADATION.

1° The degradation, during 20 hours, at pH 3,5 and 45° C, of human serumalbumin by an extract of rabbit's spleen has been measured by determining the percentage of albumin non-precipitable by 5 % trichloroacetic acid and the conditions for reproducing the reaction have been defined.

2° The study of immunological changes of albumin in relation to the stage of degradation shows that the three precipitating antigens *a*, *b*, *c* formed following the initial breakdown of the antigenic pattern of albumin are secondarily transformed into non-precipitating antigens.

3° The study of the specific precipitate formed by the anti-albumin serum and the successive samples of degraded albumin at the limit of their respective zones of excess of antibody allows the determination, independently of the immunserum used, of the stage at which the breakdown of the antigenic pattern of albumin is completed, and to correlate it to a definite stage of degradation of albumin.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] GARVEY (J. S.) et CAMPBELL (D. H.). *J. Immunol.*, 1956, **76**, 36.
- [2] GRABAR (P.) et WILLIAMS (C. A.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1953, **10**, 193 et 1955, **17**, 67.
- [3] HOLIDAY (E.). *Proc. Roy. Soc. Serie B*, 1939, **127**, 40.
- [4] KLECZKOWSKI (A.). *Brit. J. exp. Pathol.*, 1945, **26**, 24.
- [5] LAPRESLE (C.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1955, **37**, 969.
- [6] LAPRESLE (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 654.

ÉTUDE DU MÉCANISME DE LA LYSE DE *COCCUS P* (sp. *SARCINA FLAVA*) PAR LE LYSOZYME

par LOUIS COLOBERT et M^{me} JANINE LENOIR (*).

[Laboratoire de Bactériologie de la Section Technique de
Recherches et d'Etudes des Services de Santé des Armées,
108, boulevard Pinel, Lyon [Rhône] (**).]

Les nombreux travaux consacrés à l'étude de la lyse des Sarcines par le lysozyme en ont fait ressortir la complexité et les conclusions des observateurs paraissent encore contradictoires. Pour certains la lyse serait la conséquence de la dissolution spécifique de la membrane par l'enzyme [22, 15], alors que pour les autres la membrane bactérienne ne serait pas ou serait peu modifiée, mais le cytoplasme attaqué filtrerait à travers la membrane pour se répandre dans le milieu. Des observations parallèles, cytologiques et turbidimétriques, nous ont permis de préciser l'effet de la force ionique, d'en interpréter le mécanisme et de présenter une hypothèse expliquant les contradictions apparentes des observations antérieures.

I. — MÉTHODES ET TECHNIQUES.

La bactérie étudiée est celle que Beumer [3] a isolée de l'air en 1941 et décrite sous le nom de *Coccus P* (1). Elle est très voisine de *Micrococcus lysodeikticus* et possède, comme cette dernière, les caractères génériques de *Sarcina flava* dont elle semble constituer une variété.

Cette bactérie a été cultivée soit en milieu liquide agité (peptone Vaillant 5 B, 15 g ; eau de conduite, 1 000 cm³ ; pH 7,6), soit sur milieu solide (gélose nutritive ordinaire) à la température de 25°. Les récoltes ont toujours été effectuées en pleine phase exponentielle de croissance lorsque la culture se fit en milieu liquide, ou après vingt-quatre heures d'incubation lorsqu'elle se fit en milieu solide. De façon habituelle, les bactéries ont été lavées deux fois dans de l'eau distillée, puis une fois dans la solution tampon choisie. Dans les expériences

(*) Avec la collaboration technique de Véran Avy et Andrée Cavanagh.

(**) Manuscrit reçu le 26 septembre 1956.

(1) Divers travaux ont déjà été consacrés à l'étude de *Coccus P* [7, 8, 13, 14].

où l'on a étudié l'influence spécifique de divers électrolytes, les bactéries ont été lavées cinq fois à l'eau distillée et deux fois dans la solution tampon.

Le lysozyme employé est le lysozyme d'œuf cristallisé « Armour ». Dans les essais où l'on a cherché à mettre en évidence l'influence éventuelle spécifique de divers ions, on a soumis le lysozyme à une dialyse poussée pendant trois jours à la chambre froide afin d'éliminer les sels contenus dans le lysozyme commercial. Dans le même ordre d'idées, tous les réactifs utilisés ont été fabriqués à partir de produits « R. P. pour analyse », l'eau fut tridistillée dans des appareils uniquement en pyrex et les précautions habituelles en enzymologie furent prises tant pour la préparation de la verrerie que pour celle des réactifs.

Le microscope électronique est de marque Philips. Toutes les préparations ont été simplement séchées à l'air et non fixées. L'ombrage fut réalisé au palladium, la technique est celle du préombrage [28], qui seule a permis de mettre en évidence nettement le gonflement de la membrane sous l'action du lysozyme. Le décollement de la préparation après ombrage sur lame de verre, qui est le temps délicat de cette technique, est grandement facilité si l'on opère immédiatement après l'ombrage et si l'on soumet les préparations à la vapeur d'eau bouillante.

Pour l'étude cinétique turbidimétrique, nous avons utilisé l'électrocolorimètre universel tricellule « Jobin et Yvon » avec l'écran rouge n° 70.

II. — RÉSULTATS.

1° ETUDE CYTOLOGIQUE DE LA LYSE DE *Coccus P* PAR LE LYSOZYME. — Lorsque les bactéries sont remises en suspension après centrifugation elles restent agglomérées en gros amas, mais après une vive agitation elles reprennent l'aspect en *tétrades* caractéristique du genre *Sarcina*. Chaque *Coccus* se présente sous une forme soit sphérique de 1 micron environ de diamètre, soit polyédrique par compression, et totalement opaque. On distingue souvent avec netteté une capsule enveloppant chaque germe ; celle-ci est toujours plus développée lorsque la culture a été réalisée en milieu solide, son épaisseur peut alors atteindre 200 millimicrons.

L'examen de prélèvements effectués à des temps divers après addition du lysozyme à la suspension bactérienne dans des conditions où la lyse se produit, permet de suivre les altérations cytologiques des cellules (planche I). Dans une première phase extrêmement transitoire la membrane semble gonfler, prenant un aspect muqueux. Le diamètre des bactéries augmente, celles-ci s'aplatissent ; on a l'impression que la membrane s'imprègne d'eau, perd toute sa rigidité et que le cytoplasme s'étale sur le support (phase I). Puis la capsule et la membrane disparaissent laissant le cytoplasme nu, qui a pris un aspect granuleux, mûriforme. Les cellules ont ainsi l'aspect décrit sous le nom de proto-

plastiques par Weibull chez *Bacillus megaterium*, mais, pour des raisons qui seront exposées plus loin, nous préférons leur donner le nom de *gymnoplastes* proposé par Stähelin [24]. Cette phase, également très transitoire, est normalement suivie par la dispersion du cytoplasme et l'apparition à l'état libre des granules qui donnaient au gymnoplasme l'aspect d'une mûre (phase III). Ces granules eux-mêmes disparaissent complètement ; seuls quelques-uns très particuliers persistent (phase IV) ; la suspension est alors complètement éclaircie.

Lorsque les conditions physico-chimiques sont choisies pour que la vitesse de la lyse soit optima, la succession de ces différentes

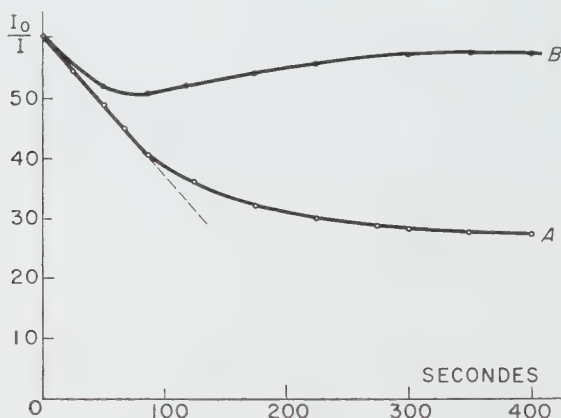


FIG. 1. — Courbe A : variation en fonction du temps du pourcentage de lumière transmise.

Noter la proportionnalité entre ces deux grandeurs pendant quatre-vingt-cinq secondes (phase spécifique).

Concentration en lysozyme : 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Température : 25°.

Courbe B : Même variation dans les mêmes conditions, mais avec une concentration de lysozyme dix fois plus élevée.

phases est difficile à saisir, mais nous avons pu cependant établir la correspondance entre elles et la variation de la turbidité de la suspension microbienne. La courbe A de la figure 1 représente cette variation. Comme on l'a noté depuis longtemps, on distingue nettement deux phases ; pendant la première, relativement très courte, la variation du pourcentage de lumière transmise en fonction du temps est linéaire, puis elle diminue progressivement, mais on arrive cependant à une clarification totale au bout d'un temps suffisamment long. Dans les conditions de nos expériences, la densité optique de départ étant de 0,800, la phase linéaire se termine lorsque la densité optique atteint 0,700 ; à titre d'exemple,

cette valeur peut être atteinte en moins d'une minute avec une concentration de lysozyme de 10 microgrammes par centimètre cube, mais il faut attendre quatre heures pour atteindre la clarification maximum, la densité optique étant alors de 0,002. Or, les quatre phases cytologiques que nous avons décrites s'observent pendant la phase de variation linéaire. Lorsque celle-ci s'achève il n'existe plus de cocci normaux ni de cocci à la phase I, on observe seulement des bactéries à la phase II (gymnoplastes) et à la phase III (granules isolés). Nous montrerons tout à l'heure qu'à ce stade l'action spécifique de l'enzyme est terminée, celui-ci ne joue aucun rôle dans la phase de dispersion du contenu du gymnoplaste où seuls interviennent des facteurs physiques du milieu.

2° INHIBITION PARADOXALE DE LA LYSÉ PAR LES FORTES CONCENTRATIONS D'ENZYME. — Si l'on élève suffisamment la concentration du lysozyme, les phénomènes se présentent tout à fait différemment, ainsi que Wilcox et Daniel [27] l'ont déjà signalé. Dans les conditions de l'expérience que nous venons de décrire, en la portant à 100 microgrammes par centimètre cube au lieu de 10, la courbe représentative de la variation de turbidité n'est plus la courbe A, mais la courbe B de la figure 1. La turbidité, après une légère diminution au départ, se maintient en plateau, remonte à sa valeur primitive et se maintient ainsi indéfiniment. Tout se passe comme si l'activité du lysozyme était totalement inhibée. Il n'en est cependant rien, car l'examen au microscope électronique prouve que les bactéries sont profondément altérées (planche II) et ont l'aspect de *protoplastes* : le cytoplasme est devenu transparent et présente cet aspect caractéristique granuleux, en mûre ; le diamètre de la bactérie est considérablement augmenté, mais l'épaisseur est très diminuée ; le corps bactérien s'est étalé sur la préparation. L'aspect est identique à celui de la phase I précédemment décrite, mais qui était difficile à saisir à cause de sa précocité et de son peu de durée. Comme la membrane est visible sous forme d'une masse d'aspect muqueux, très gonflée et étalée, mais enrobant entièrement le corps bactérien, nous dirons qu'à ce stade les bactéries sont à l'état d'*angioplastes*, par opposition à la dénomination de *gymnoplastes* que nous avons retenue pour caractériser la phase II. Cette observation nous paraît essentielle : lorsque la concentration de lysozyme est suffisamment élevée, la membrane bactérienne manifestement très altérée ne se dissout cependant pas complètement et le contenu bactérien ne se disperse pas brusquement dans le milieu. Du point de vue néphélométrique l'opacité de ces suspensions d'*angioplastes* est plus grande que celle des suspensions microbiennes primitives.

Un évolution se produit cependant au sein de ces suspensions d'*angioplastes*, ainsi que l'illustrent les photographies de la planche II. Le cytoplasme bactérien diffuse lentement au travers de cette enveloppe visqueuse provenant de la transformation de la membrane ; le contenu granuleux de l'*angioplaste* devient de plus en plus transparent et finalement l'enveloppe vide donne l'aspect dit de *fantôme* (2). Seul un élément persiste longtemps à l'intérieur de chacun de ces *fantômes* avant de finir par disparaître : c'est un granule de 27 millimicrons de diamètre environ. Un fort grossissement montre qu'il n'est d'ailleurs pas homogène, mais formé de grains beaucoup plus petits (planche II, *l*). Ces granules sont identiques à ceux qui sont observés à l'état libre au stade terminal (phase IV) de la lyse (planche I, *g*). Leur individualité cytologique nous paraît certaine, mais leur identification à des organites connus est délicate et nécessite des travaux d'histochimie et d'histophysiologie qui sont actuellement en cours au laboratoire.

Il est facile de montrer que le rapport de la concentration en lysozyme relativement à la concentration en substrat est bien le facteur principal intervenant dans le phénomène d'inhibition paradoxale. Ainsi, dans les conditions des expériences précédentes, en maintenant constante la concentration de lysozyme à 100 microgrammes par centimètre cube, mais en élevant la concentration de bactéries le phénomène de lyse réapparaît ; lorsque la concentration de ces dernières devient suffisante, les courbes de lyse reprennent l'aspect classique (fig. 1, courbe A). L'augmentation de la concentration en bactéries a donc le même effet que la diminution de la concentration en enzyme. C'est encore ce que montre l'expérience très démonstrative suivante : si l'on ajoute à une suspension d'*angioplastes* dont la densité optique demeure constante depuis plusieurs heures une nouvelle quantité de germes frais, la lyse démarre immédiatement, la turbidité diminue, tombe au-dessous de la valeur qu'elle avait avant l'addition de germes et un nouveau palier peut même se constituer.

3° INHIBITION DE LA LYSE PAR ABAISSEMENT DU pH. PHÉNOMÈNE DE NAKAMURA. — Les expériences précédentes ont été réalisées à pH 6,2, dans un tampon phosphate disodique-monopotasique M/15, c'est-à-dire dans des conditions qui, pour beaucoup d'auteurs, sont les conditions optima de pH pour le lysozyme [4, 26], mais le phénomène d'inhibition paradoxale subit fortement l'influence du pH ; on obtient en effet le phénomène

(2) Il est remarquable que les suspensions de ces *fantômes* conservent encore une opacité voisine de celle de la suspension bactérienne primitive.

d'inhibition pour des concentrations en lysozyme d'autant plus faibles que celui-ci est plus bas. A pH 4 (tampon acétate M/15) l'inhibition est complète pour une concentration de 40 microgrammes par centimètre cube d'enzyme et cependant l'examen au microscope électronique montre que les bactéries se présentent sous l'aspect typique d'*angioplastes* ; il suffit d'ailleurs de ramener le pH à 6,2 pour observer une lyse instantanée consécutive à la dissolution de leur enveloppe. Ce phénomène n'est autre que celui décrit depuis longtemps par Nakamura [19],

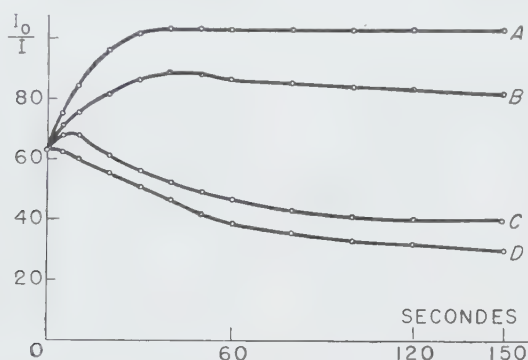


FIG. 2. — Influence de la concentration en enzyme (pH 5,3 ; tampon phosphate, M/7,5 ; température, 25°).

A. Concentration de lysozyme : 1 000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$; B. Concentration de lysozyme : 500 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$; C. Concentration de lysozyme : 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$; D. Concentration de lysozyme : 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

En abscisses le temps en secondes, en ordonnées le pourcentage de lumière transmise.

désigné depuis sous son nom et étudié récemment par Grula et Hartsell [16]. Cette continuité entre le phénomène d'inhibition de la lyse par augmentation de la concentration en enzyme (phénomène paradoxal) et l'inhibition par abaissement du pH (phénomène de Nakamura) montre qu'ils sont vraisemblablement de même nature. Nous verrons effectivement que les mêmes mécanismes entrent en jeu.

4° INFLUENCE DE LA FORCE IONIQUE SUR LES PHÉNOMÈNES PRÉCÉDENTS. — Le pH 5,3 en tampon phosphates monopotassique-disodique M/7,5 s'étant révélé très favorable, a été adopté pour l'étude du mécanisme de ces phénomènes d'inhibition.

La figure 2 montre qu'à ce pH, non seulement la lyse est inhibée pour les plus fortes concentrations en lysozyme, mais

qu'une très forte augmentation de la turbidité se manifeste : pour la concentration de lysozyme de 100 microgrammes par centimètre cube la densité optique passe de 0,800 à 1,070. Puisque les *angioplastes* de *Coccus P* ont un diamètre beaucoup plus grand que celui des bactéries normales (3), il paraît naturel de voir dans ce dernier fait une explication du premier. L'augmentation de la turbidité devient moins apparente lorsque la concentration de lysozyme diminue, elle peut échapper à l'observation lorsque la lyse est rapide. En réalité, un examen attentif permet toujours de la dépister, soit par une très légère augmentation de l'opacité pendant les premières secondes qui suivent l'addition de l'enzyme, soit par un changement de pente de la droite représentative de la première phase de lyse dans cette période initiale. Lorsqu'un plateau durable est obtenu il suffit, comme nous l'avons signalé, de ramener le pH vers la neutralité pour provoquer instantanément une lyse, mais il est également possible de provoquer ce phénomène par addition de sels neutres (pl. II, *m*). Ainsi, si, dans le cadre de l'expérience B décrite par la figure 1, on ajoute le volume nécessaire d'une solution concentrée de chlorure de sodium pour obtenir la concentration finale M/50, on obtient une lyse immédiate. La densité optique tombe instantanément de 0,800 à 0,006. Le même effet peut être obtenu par addition de chlorure de potassium ou de nitrate de sodium employés à la même concentration ; par contre, l'addition de saccharose, même à des concentrations extrêmement élevées, ne permet pas d'observer ce phénomène, bien qu'elle provoque une diminution marquée du volume des bactéries ou des *angioplastes*. Ces derniers se contractent, mais l'enveloppe visqueuse dérivant

(3) Un gonflement analogue a été observé par Grula et Hartsell [45] sur *Micrococcus lysodeikticus*.

PLANCHE I

Aspects cytologiques de la lyse dans les conditions où celle-ci est maxima : a) Cocci normaux avant l'action du lysozyme. $\times 22\ 000$; b) Stade initial extrêmement transitoire. On distingue autour de la tétrade de cocci dont les limites sont devenues floues, une enveloppe qui s'étale. $\times 15\ 000$; c) Deuxième stade. Aspect dit de *gymnoplaste*. L'enveloppe extérieure entourant la tétrade a disparu ; chaque coccus est libre, nu et présente un aspect granuleux, en mûre, caractéristique. On observe dans le même champ des cocci à des degrés d'altération plus ou moins avancés. $\times 6\ 000$; d) Même stade, plus fort grossissement. $\times 10\ 000$; e) Troisième stade : dispersion des grains auxquels est dû l'aspect en mûre du *gymnoplaste*. $\times 9\ 000$; f) Quatrième stade : Les grains libérés au stade précédent ont disparu, seuls persistent encore des granules d'un type particulier, identiques à ceux qui persistent dans les *fantômes* (cf. *k* et *l*, planche II). $\times 9\ 000$; g) Un de ces granules à un fort grossissement. On voit qu'il est constitué lui-même de granules plus petits.

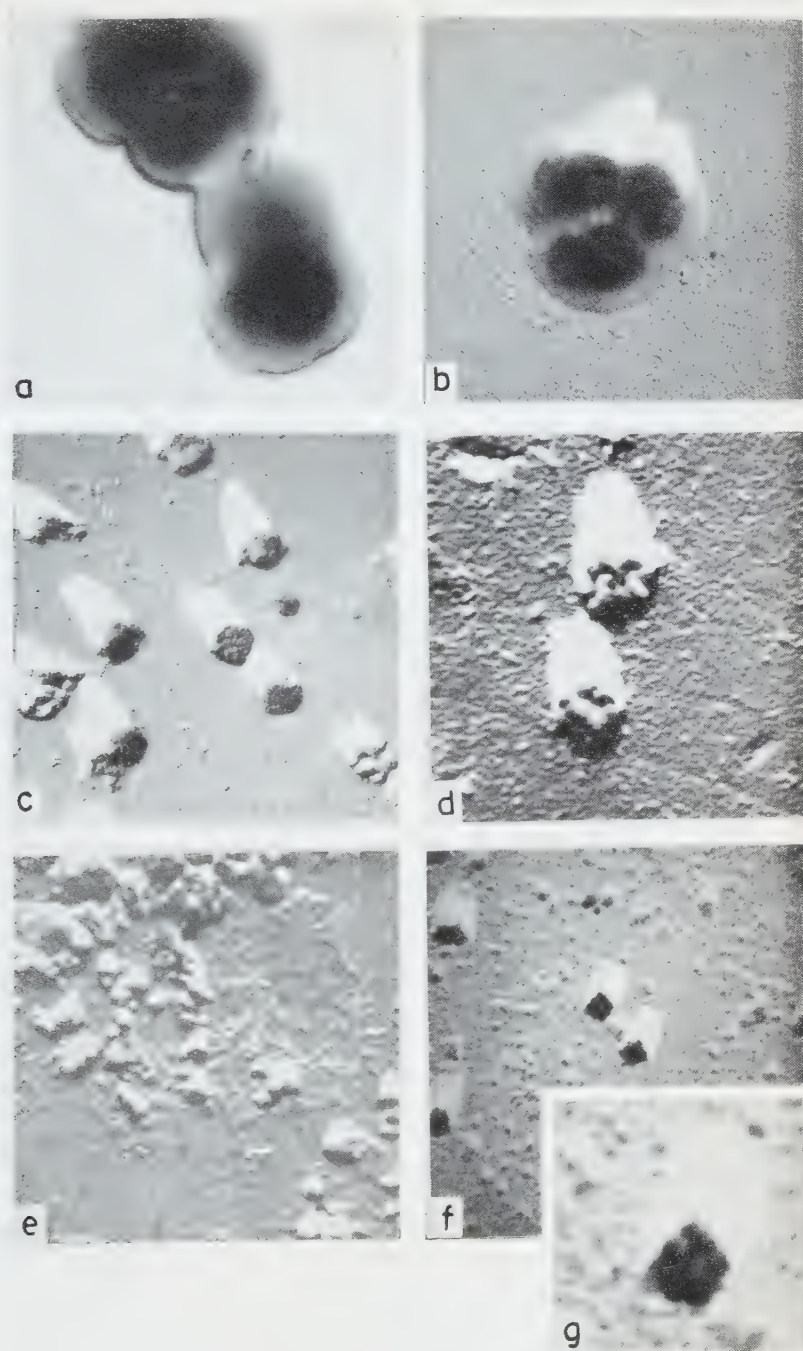


PLANCHE I.

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

PLANCHE II

Aspects cytologiques de *Coccus P* subissant l'action du lysozyme dans les conditions de « l'inhibition paradoxale de la lyse » : *h*) Aspect initial, comparer avec *d*, planche I. On observe des cocci à des stades divers d'altération, mais ils sont tous enveloppés dans une gangue d'aspect muqueux. $\times 7\,000$; *i*) Tétrades isolées au stade initial. L'enveloppe muqueuse est très visible ; aspect identique à celui de *b*, planche I. $\times 8\,000$; *j*) Détail de *h*. Comparer avec *c*, planche I : même aspect mûriforme du cytoplasme, mais ici l'enveloppe muqueuse persiste. Cet aspect caractéristique définit l'*angioplaste*. $\times 10\,000$; *k*) L'exosmose du cytoplasme des tétrades microbiennes est achevée. L'enveloppe ne contient plus que des granules d'un type très particulier. Aspect dit de *fantôme*. $\times 10\,000$; *l*) Un de ces organites à l'intérieur d'un *fantôme*. Comparer avec *g*, planche I. $\times 75\,000$; *m*) Effet de l'addition de chlorure de sodium à une suspension d'*angioplastes*. Dissolution instantanée de l'enveloppe et dispersion du contenu microbien avant sa solubilisation complète. $\times 11\,000$.

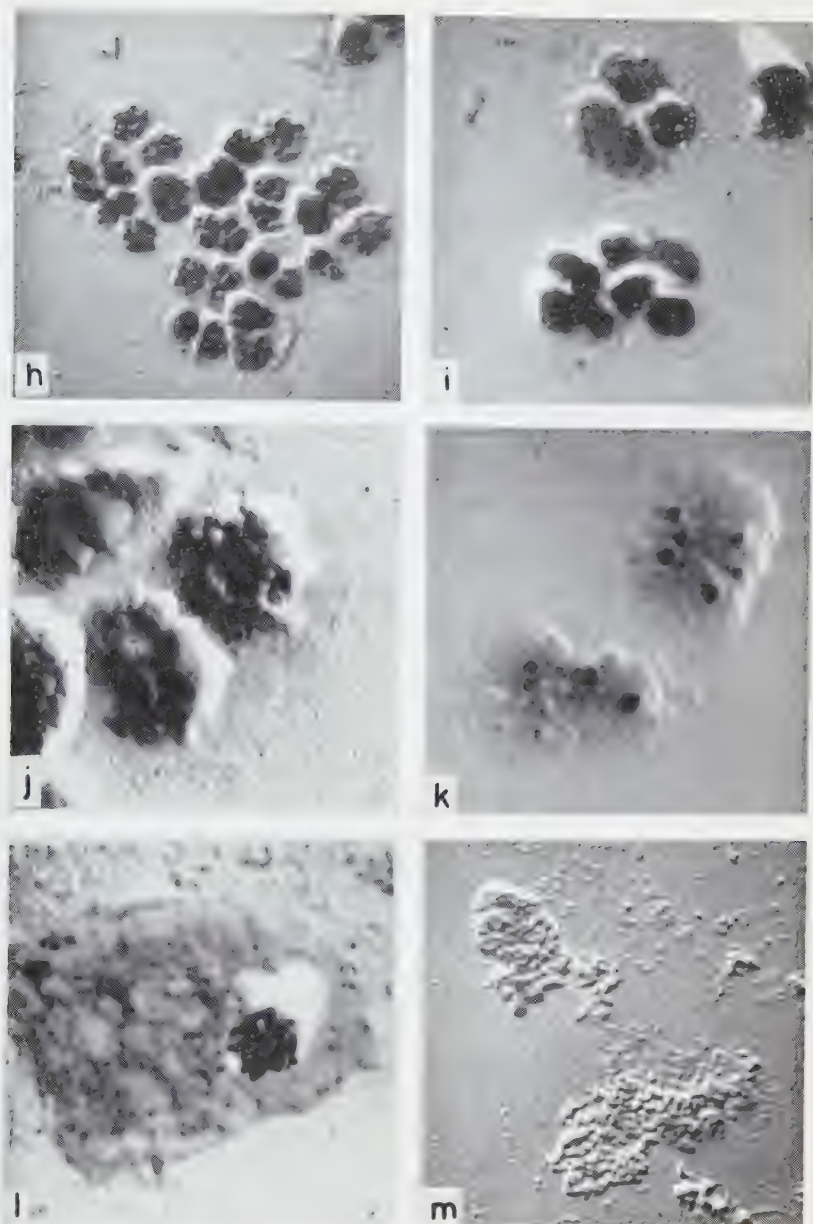


PLANCHE II.

de la membrane ne se dissout pas et le cytoplasme ne peut se disperser brusquement. La propriété des ions de dissoudre ces enveloppes est donc indépendante de leur nature chimique et ne peut être rapportée à leur pression osmotique.

L'introduction de sels neutres à la même concentration que précédemment dans le tampon avant l'introduction du lysozyme a pour effet de supprimer l'inhibition paradoxale, au moins partiellement. Nous avons constaté qu'il existe une concentration optima de chlorure de sodium ou des autres sels pour provoquer la lyse totale dans le minimum de temps, et cet optimum varie avec la concentration de lysozyme : il est d'autant plus élevé que la concentration en lysozyme est elle-même plus élevée. Il n'est d'ailleurs pas nécessaire de faire appel aux seuls sels neutres pour obtenir ce résultat, l'augmentation de la concentration moléculaire du tampon permet également de le réaliser (tableau I).

TABLEAU I.

Concentration du tampon phosphate	densité optique obtenue en 15 mn à 23° pour les concentrations de lysozyme de		
	10 $\mu\text{g}/\text{cm}_3$	50 $\mu\text{g}/\text{cm}_3$	100 $\mu\text{g}/\text{cm}_3$
2M/15	0,200	0,200	0,360
M/15	0,230	0,500	0,500
M/30	0,260	0,810	0,870
M/60	0,290	0,970	1,080
M/120	0,310	1,020	1,180
M/240	0,330	1,020	1,250
0	0,350	1,010	1,250
Influence de la concentration du tampon et de la concentration de lysozyme sur la lyse. Après 15 mn celle-ci n'évolue plus qu'extrêmement lentement. La densité optique de départ est 0,800			

5° DANS LE PHÉNOMÈNE D'INHIBITION PARADOXALE ET DANS CELUI DE NAKAMURA LE LYSOZYME RESTE FIXÉ SUR LES ANGIOPLASTES. — Pour préciser le mécanisme d'action des ions dans la dissolution des vestiges de la membrane, il a paru essentiel de savoir si, au stade des *angioplastes*, l'action enzymatique spécifique du lysozyme est terminée ou non. Dans ce but nous avons recherché si le lysozyme restait libre en solution dans les suspensions d'*angioplastes* ou s'il restait fixé sur ces derniers. On sait en

effet, depuis Fleming, que le lysozyme introduit dans une suspension de bactéries sensibles est rapidement fixé par elles, mais qu'à la fin de la lyse l'enzyme est intégralement retrouvé dans la solution ; il peut être utilisé à dissoudre de nouvelles bactéries, récupéré et ainsi de suite [41]. Nous avons répété ces expériences qui prouvent qu'il n'existe pas de produits inhibiteurs du lysozyme dans les produits de la lyse, puis nous avons titré le lysozyme dans le surnageant des *angioplastes* après centrifugation. Nous avons constaté qu'une suspension d'*angioplastes* dont la densité

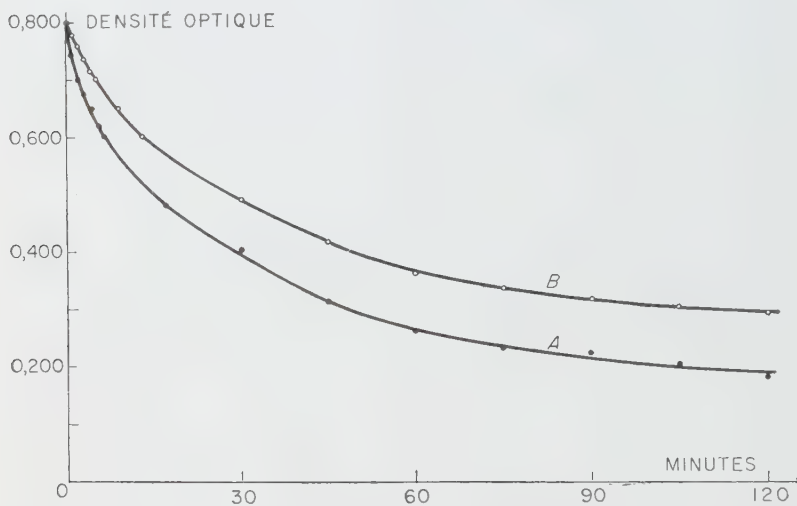


FIG. 3. — Influence de la température sur la cinétique de lyse :

A : température, 37° ; B : température, 27°.

En faisant une translation de 0,100 le long de l'axe des ordonnées parallèlement aux abscisses, la courbe A entre en coïncidence avec la courbe B sur toute sa longueur à partir du point correspondant à l'abscisse huit minutes.

est 0,800 fixe 100 microgrammes de lysozyme : pour cette concentration on ne retrouve aucune activité dans le surnageant ; si la concentration est plus élevée on retrouve l'excédent à l'état libre. Le lysozyme fixé peut être récupéré à partir des *angioplastes*, il suffit de laver le culot dans le même tampon, puis de le remettre en suspension dans un volume de tampon égal au volume primitif et de le dissoudre en ajoutant du chlorure de sodium ; toute l'activité enzymatique se retrouve alors dans la solution.

6° DISTINCTION ENTRE PHASE SPÉCIFIQUE ET PHASE NON SPÉCIFIQUE AU COURS DE LA LYSE. — Les expériences précédentes permettent

de conclure que le cycle enzymatique n'est pas terminé au cours des phénomènes d'inhibition, puisque le lysozyme n'est pas retrouvé à l'état libre. Nous avons cherché à savoir à partir de quel moment ou de quel stade cytologique il le devient. Pour cela nous avons étudié l'influence de la température sur la cinétique de la lyse suivie au photomètre et contrôlée par des examens microscopiques ; en effet, tant que l'éclaircissement de la suspension microbienne est directement lié à une action enzymatique, sa vitesse doit subir fortement l'effet d'une augmentation de température ; au contraire, cette dernière n'aurait qu'un effet nul ou peu marqué à partir du moment où des facteurs physiques interviennent seuls. La figure 3 montre clairement les résultats : une augmentation de 10° double la vitesse de clarification pendant toute la durée de la phase linéaire, mais elle n'a aucun effet sur la vitesse d'éclaircissement à partir de la fin de celle-ci : en faisant glisser la courbe A d'une valeur correspondant à 0,100 de densité optique parallèlement à l'axe des abscisses, elle entre en coïncidence avec la courbe B. Ceci nous amène donc à distinguer deux phases dans la lyse des microbes : une première qui dure tant que la variation du pourcentage de lumière transmise en fonction du temps est linéaire, c'est la *phase spécifique* au bout de laquelle toute action enzymatique est terminée ; une seconde au cours de laquelle la clarification se poursuit jusqu'à devenir totale : c'est la *phase non spécifique* dans laquelle ne semble plus intervenir aucun processus enzymatique.

DISCUSSION.

Depuis les premières observations de Boasson en 1938 réalisées au microscope à fond noir, de nombreux travaux ont été consacrés à l'étude cytologique de la lyse des Sarcines, sans cependant que la lumière soit encore complètement établie. On peut, en effet, classer les observateurs en deux catégories dont les conclusions sont apparemment contradictoires. Pour les uns, les altérations de la membrane bactérienne au cours de la lyse sont faibles ou nulles et le lysozyme interviendrait en modifiant le cytoplasme qui diffuserait à travers la membrane. C'est notamment l'opinion de Boasson [4], qui observe que la membrane ne disparaît pas quoique sa structure soit suffisamment modifiée pour laisser diffuser les produits de la lyse du cytoplasme par le lysozyme. La clarification du milieu est simplement attribuée à des changements d'indice de réfraction du contenu cellulaire, le volume limité par la membrane demeurant à peu près le même. Les conclusions de Babudieri et Bietti [2] après une étude au microscope électronique sont assez voisines de celles de Boasson : le lysozyme digère graduellement le contenu cellulaire sans rupture de la

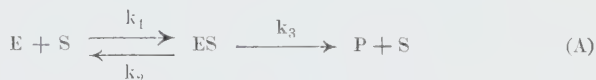
membrane. Les cellules digérées augmentent de volume et se vident de leur contenu : on aboutit finalement à une membrane transparente sans structure interne. Cependant, Kern et collaborateurs [47] décrivent une déchirure de la membrane permettant au contenu cellulaire de se disperser, mais finalement la membrane vidée persiste et elle retient en général deux granules. Nemes et Wheatcroft [20], enfin, confirment que la membrane bactérienne persiste après l'action du lysozyme et pour eux comme pour Boasson, Babudieri et Bietti, il n'y a pas rupture de la membrane et le lysozyme agit en solubilisant le cytoplasme par une digestion progressive.

Au contraire de ces observateurs, un autre groupe affirme que le contenu cellulaire n'est pas modifié, au moins directement, par le lysozyme et que l'activité enzymatique de l'enzyme se limite à l'attaque de la membrane bactérienne qu'il peut dissoudre complètement. C'est notamment l'opinion de Grula et Hartsell [45]; les expériences de Salton [22], particulièrement démonstratives puisqu'elles portent sur des préparations de membrane dépouillées du contenu bactérien obtenues par broyage mécanique, ne laissent aucun doute sur le fait que le lysozyme est susceptible de dissoudre les membranes des Sarcines. Dans cet ordre d'idées, les travaux de Epstein et Chain [40] et de Meyer et Hahnel [21] montrant que les préparations de polysaccharides de ces germes sont chimiquement modifiées par le lysozyme et également les travaux de Weibull, Mc Quillen, Welshimer, sur *Bacillus megaterium* dont la membrane peut être dissoute par le lysozyme sans que le protoplasme soit physiologiquement altéré, sont également de puissants arguments en faveur de l'idée que les polysaccharides de la membrane des Sarcines et de certains *Bacillus* [12, 18, 24] sont des substrats naturels du lysozyme.

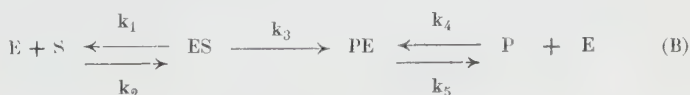
Nos observations permettent de comprendre facilement comment on a pu ainsi aboutir à des conclusions aussi contradictoires. Tous les auteurs du premier groupe se sont placés dans les conditions du « phénomène d'inhibition paradoxale » plus ou moins partiel, et les images qu'ils ont pu alors observer sont celles de la planche II. Leur conclusion naturelle ne pouvait être que celle d'une digestion progressive du cytoplasme et de non altération de la membrane puisque celle-ci se retrouve en fin de lyse sous forme de *fantôme*. Ces auteurs ont également bien noté le phénomène de gonflement [2] et même la persistance d'un ou deux granules dans les membranes vides [47]. Même Grula et Hartsell, qui insistent cependant sur le fait que l'action spécifique du lysozyme se limite à l'attaque des polysaccharides de la membrane et ont noté l'importance de la concentration en sels du milieu, n'ont observé que des images analogues pour ne s'être pas placés dans des conditions de lyse optima. De ce fait, comme

nous le verrons plus loin, nous ne pouvons accepter les détails de leur interprétation ni le mécanisme qu'ils invoquent.

La cause essentielle des divergences des auteurs nous semble provenir de ce qu'on ne s'est pas aperçu du fait (ou qu'on n'y a pas attribué assez d'importance) que les enveloppes qui, une fois vides, constituent les *fantômes* ne représentent pas la membrane bactérienne intacte, mais bien la membrane dégradée par le lysozyme. Si l'on considère l'équation générale (A) par laquelle on représente habituellement une action enzymatique, dans laquelle E représente l'enzyme, S le substrat, ES le complexe enzyme-substrat et P les produits d'hydrolyse :



l'enveloppe vide qui constitue les *fantômes* ne peut en rien être assimilée à S ni à ES, ni à P. Le gonflement considérable de l'enveloppe bactérienne qui constitue le premier temps de l'action du lysozyme et qu'on peut toujours retrouver même lorsque la vitesse de la lyse est maxima, l'aspect semi-fluide de cette enveloppe qui contraste avec la rigidité de la membrane des bactéries intactes rendent impossible de la confondre avec celle-ci quoiqu'elle en dérive manifestement. Elle ne peut correspondre non plus au complexe enzyme-substrat comme le supposent Wilcox et Daniel [27], car la simple fixation d'une couche de molécules de protéine sur la membrane intacte ne peut être perceptible au microscope électronique. Elle ne constitue pas non plus le stade ultime de la dégradation enzymatique, puisque nous avons montré que le lysozyme γ est encore fixé (§ 5) et qu'il est possible d'en obtenir la dissolution avec libération de l'enzyme (pl. II, m). En réalité, ce dernier phénomène impose l'idée que l'enveloppe qui a pris l'aspect d'un *fantôme* représente le complexe PE, c'est-à-dire les produits de dégradation enzymatique sur lesquels reste fixé l'enzyme. On sait que l'affinité de l'enzyme pour les produits de dégradation d'un substrat est un phénomène fréquent en enzymologie ; c'est à lui qu'on attribue notamment les phénomènes d'inhibition non compétitive et c'est par lui que l'on interprète la pseudo-cinétique d'ordre I suivie par certaines réactions enzymatiques. Dans cette hypothèse, en désignant par PE le complexe « produits de dégradation-lysozyme », on peut représenter par l'équation (B) l'action du lysozyme sur la membrane des Sarcines,



la vitesse finale de la réaction étant déterminée par le rapport des constantes de vitesse k_4/k_5 .

Le mécanisme de l'action des sels est alors clair. Nous avons noté (§ 4) que ces derniers n'interviennent que par des propriétés physiques, mais, contrairement à ce que pensent Grula et Hartsell, ce n'est pas la pression osmotique, mais la charge électrique des ions qui joue le rôle essentiel. En effet, si l'on compare la formation de complexes PE avec les nombreux complexes d'association souvent insolubles que peut former le lysozyme (protéine basique) avec des substances ionisées négativement aussi diverses que des gluco-protéines [6], le sulfate de chondroïtine [4], les acides nucléiques [23], des polymères acides [23], des résines échangeuses d'ions ou même avec des protéines, telles que la pepsine [5], la salmine, la sérulalbumine [25] ou la conalbumine [9], et que l'on considère que tous ces complexes sont facilement dissociables par addition de sels neutres, il paraît logique de supposer qu'il s'agit également, dans le cas présent, d'une affinité d'ordre électrostatique, la force ionique intervenant sur

l'équilibre $PE \xrightleftharpoons[k_5]{k_4} P + E$ par modification du rapport des vitesses k_4/k_5 .

Grula et Hartsell ont avancé que des processus enzymatiques d'autolyse joueraient peut-être pour faciliter l'exosmose du contenu microbien dans les conditions de l'inhibition paradoxale. L'influence de la température sur la cinétique de la lyse (§ 6) nous permet d'éliminer cette hypothèse, car, dans ce cas, elle devrait rester sensible dans toute la durée de la phase non linéaire de clarification pendant laquelle, rappelons-le, la chute de la densité optique des suspensions bactériennes se produit pour les 7/8. Lorsque se termine la phase linéaire de variation de pourcentage de lumière transmise, c'est-à-dire dans les conditions de nos expériences, lorsque la densité optique des suspensions a baissé du 1/8 de sa valeur de départ, l'action spécifique du lysozyme est terminée, la destruction du substrat complète. Nous avons donc proposé d'appeler cette phase « phase spécifique » par opposition à la suivante dite « phase non spécifique », où ne semblent intervenir que des facteurs physiques.

CONCLUSIONS.

1° L'action du lysozyme sur *Coccus P* (sp. *Sarcina flava*) se limite à la dissolution de la membrane. Elle atteint son terme par la destruction totale du substrat quand s'achève la phase linéaire de la variation du pourcentage de lumière transmise par les suspensions de bactéries en fonction du temps (phase spéci-

fique). Aucun phénomène enzymatique, autolytique ou autre, ne semble intervenir dans la dispersion du contenu microbien qui se produit consécutivement à la dissolution de la membrane (phase non spécifique).

2° Le lysozyme a de l'affinité pour les produits de dégradation de la membrane qui naissent de son action. Il forme avec eux des complexes d'association insolubles, décomposables par élévation de la force ionique du milieu.

3° En utilisant une force ionique suffisamment faible ou une concentration en lysozyme suffisamment élevée, les bactéries se transforment en *angioplastes* par altération de la membrane, la cohésion du cytoplasme bactérien étant encore assurée par l'insolubilité des produits de désintégration de la membrane tant que le lysozyme y reste fixé. L'élévation de la force ionique ou la diminution relative de la concentration en enzyme a pour effet de dissocier le complexe « produits de dégradation-lysozyme » en entraînant du même coup la dispersion du cytoplasme bactérien.

4° Le phénomène de Nakamura s'explique par la diminution de la vitesse de dissociation du complexe « produits de dégradation-lysozyme » lorsque le pH s'abaisse. Ce phénomène peut être en partie compensé par une augmentation convenable de la force ionique.

SUMMARY.

MECHANISM OF *COCCUS P* LYSIS (SP. *Sarcina flava*) BY LYSOZYME.

1° The action of lysozyme on *Coccus P* (sp. *Sarcina flava*) is limited to the dissolution of the membrane. Its ends with the complete destruction of the substrate when the linear phase of the variation, as a function of time, of the percentage of light transmitted by the bacterial suspension, is terminated (specific phase). No enzymatic phenomenon: autolytic or other, seems to interfere with the dispersion of the microbial contents, which occurs after the dissociation of the membrane (unspecific phase).

2° Lysozyme has an affinity for the membrane's degradation compounds produced by its own action. It constitutes with them insoluble association complexes which may be decomposed by an increase of the ionic strength.

3° On using an ionic strength weak enough or a sufficiently high lysozyme concentration, the bacteria are transformed into *angioplasts* by an alteration of the membrane; the cohesion of the cytoplasm is maintained by the insolubility of the membrane's degradation products as far as lysozyme is fixed on them. An increase of the ionic strength or a relative decrease of the enzymatic concentration produces the dissociation of the complex

« degradation compounds-lysozyme », which brings with it the dispersion of the bacterial cytoplasm.

4° The Nakamura phenomenon can be explained by the decrease of the dissociation speed of the complex « degradation compounds-lysozyme » when the pH is lowered. This phenomenon may be partly compensated by a convenient increase of the ionic strength.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BADIN (J.) et SCHUBERT (M.). *J. clin. Invest.*, 1955, **34**, 1312.
- [2] BABUDIERI (B.) et BIETTI (G. B.). *Arch. Ophthalm.*, 1945, **33**, 449.
- [3] BEUMER (J.). *Acta biol. Belg.*, 1941, **2**, 273 et 276.
- [4] BOASSON (E. H.). *J. Immunol.*, 1938, **34**, 281.
- [5] CAPUTO (A.). *Experientia*, 1955, **11**, 400.
- [6] CASELLI (P.) et SCHUMACHER (H.). *Z. ges. exp. Med.*, 1955, **126**, 417.
- [7] COLOBERT (L.). *Thèse Sciences* n° 3728, Paris, 1955.
- [8] COLOBERT (L.) et DE MENDE (S.). *J. Chim. Phys. France*, 1956, 206.
- [9] EHRENPREIS (S.) et WARNER (R. C.). *Arch. Bioch. Bioph.*, 1956, **61**, 38.
- [10] EPSTEIN (L. A.) et CHAIN (E.). *Brit. J. exp. Pathol.*, 1940, **21**, 339.
- [11] FLEMING (A.) et ALLISON (V. D.). *Proc. Roy. Soc.*, série B, 1923, **94**, 142.
- [12] GLADSTONE (G. P.) et JOHNSON (H. H.). *Brit. J. exp. Pathol.*, 1955, **6**, 231.
- [13] GORINI (L.) et LANZAVECCHIA (J.). *Bioch. Bioph. Acta*, 1954, **14**, 407 et **15**, 399.
- [14] GORINI (L.) et LORD (R.). *Bioch. Bioph. Acta*, 1955, **19**, 84.
- [15] GRULA (E. A.) et HARTSELL (S. E.). *J. Bact.*, 1954, **68**, 171.
- [16] GRULA (E. A.) et HARTSELL (S. E.). *J. Bact.*, 1954, **68**, 302.
- [17] KERN (R. A.), KINGKADE (M. J.), KERN (S. F.) et BEHRENS (C. K.). *J. Bact.*, 1951, **61**, 171.
- [18] MAC QUILLEN (K.). *J. gen. Microbiol.*, 1956, **14**, Xii.
- [19] NAKAMURA (O.). *Z. Immun. Forsch.*, 1923-1924, **39**, 425.
- [20] NEMES (J. L.) et WHEATCROFT (M. G.). *Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol.*, 1952, **15**, 653.
- [21] MEYER (K.) et HAHNEL (E.). *J. biol. Chem.*, 1946, **163**, 723.
- [22] SALTON (M. R. J.). *Nature*, 1952, **170**, 746.
- [23] SKARNES (R. C.) et WATSON (D. W.). *J. Bact.*, 1955, **70**, 110.
- [24] STAHELIN (H.). *Schweiz. Z. allg. Path.*, 1954, **17**, 310.
- [25] STEINER (R. F.). *Arch. Bioch. Bioph.*, 1953, **47**, 56.
- [26] THOMPSON (R.). *Arch. Path.*, 1940, **30**, 1096.
- [27] WILCOX (F. H.) et DANIEL (L. J.). *Arch. Bioch. Bioph.*, 1954, **52**, 305.
- [28] WILLIAMS (R. C.) et BACKUS (R. C.). *J. appl. Physics*, 1949, **98**, 20.

**INFLUENCE DE LA QUANTITÉ D'IODE
FIXÉE SUR LES PROTÉINES SÉRIQUES NORMALES
ET MODIFIÉES PAR LA CHALEUR
SUR LA PHAGOCYTOSE DE CES COLLOÏDES
PAR LES CELLULES DU S. R. E.**

par G. BIOZZI, B. BENACERRAF, C. STIFFEL, B. N. HALPERN et D. MOUTON *)

(*Laboratoire de Médecine Expérimentale de la Clinique Propé-
deutique de l'Hôpital Broussais [professeur PASTEUR VALLÉRY-
RADOT], C. N. R. S., et Centre de Recherches Allergiques de
l'Association Claude-Bernard*)

Il est connu depuis les travaux de Van der Scheer et coll. [1] qu'en chauffant le sérum sanguin à 60° il se forme des agrégats constitués par l'union des albumines et des globulines. Ces complexes sont solubles et susceptibles d'être isolés. Nous avons montré que ces complexes albumino-globuliniques (C. A. G.), injectés par voie veineuse à l'animal, sont phagocytés par les cellules du S. R. E. en contact direct avec le sang circulant [2]. La preuve de cette phagocytose nous est fournie indirectement par l'étude de l'effet compétitif, exercé par cette substance sur la vitesse de phagocytose des particules de carbone injectées en même temps à l'animal.

Les constituants normaux du sérum sanguin non chauffé n'influencent pas la phagocytose des particules de carbone.

Pour avoir une mesure directe de la cinétique de la phagocytose des particules du C. A. G., nous avons iodé cette protéine avec de l'iode contenant du ^{131}I . Nous avons ainsi démontré que la fixation des particules du C. A. G. dans le S. R. E. est régie par les mêmes lois qui gouvernent la phagocytose des colloïdes d'autre nature, tels que le carbone, le saccharate d'oxyde de fer et aussi les globules rouges hétérologues. Au cours de cette étude, un fait nouveau a attiré notre attention : les particules du C. A. G. fortement iodé sont phagocytées de préférence à celles du C. A. G. non iodé, quand les deux formes sont offertes en

(*) Manuscrit reçu le 29 juillet 1956.

même temps à la cellule réticulo-endothéliale. Cette préférence dans la phagocytose semble être conditionnée par la quantité d'iode fixée sur le C. A. G. Dans le présent travail, nous nous proposons d'étudier l'influence du degré d'iodation du C. A. G. et des globulines sériques sur la vitesse de leur épuration sanguine et sur leur distribution dans les organes.

Dans nos travaux précédents [3, 4], nous avons montré que l'index phagocytaire K (1) de l'équation $C = C_0 \cdot 10^{-KT}$ qui exprime la vitesse de phagocytose des particules, est inversement proportionnel à la dose (D) injectée suivant l'équation : $K \cdot D = \text{cte}$.

Cette relation est une des caractéristiques fondamentales de la phagocytose des particules par les cellules du S. R. E. La sensibilité du dosage du ^{131}I fixé sur le C. A. G. nous a permis de reprendre l'examen de ce point essentiel et d'en étendre l'étude à la phagocytose de doses très faibles de C. A. G. Nous avons ainsi établi les limites de validité de la relation $K \cdot D = \text{cte}$.

La possibilité d'utiliser des protéines modifiées par la chaleur et légèrement iodées pour l'étude du S. R. E. chez l'homme nous a amenés à préciser le pouvoir antigénique éventuel de ces produits d'origine homologue. Nous avons aussi étudié les répercussions de l'injection d'une dose exploratrice de C. A. G. sur la fonction phagocytaire ultérieure des cellules réticulo-endothéliales.

Dans la deuxième partie de ce travail nous étudions l'influence du degré de iodation du C. A. G. et des globulines sériques de cheval sur les phénomènes de phagocytose préférentielle. Une nouvelle technique nous permettra de mesurer le degré de préférence avec lequel ces différentes préparations sont phagocytées par rapport aux granules de carbone.

TECHNIQUE.

a) PRÉPARATION DU C. A. G. — Le sérum sanguin de l'espèce animale choisie est chauffé au bain-marie à 60° C pendant trente minutes, le thermomètre étant placé dans le récipient contenant le sérum. Après refroidissement, le pH est ramené à 6 avec HCl et le sérum est dialysé contre de l'eau distillée pendant vingt-quatre heures. Il se forme un précipité qui est recueilli par centrifugation et lavé à l'eau distillée jusqu'à disparition du trouble formé par addition d'acide trichloracétique 20 p. 100 au surnageant. Le précipité est dissout dans du sérum physiologique à 9 p. 1 000 en portant le pH à 7,5 avec NaOH. La solution additionnée de merthiolate à 1/5 000 est gardée à la glacière à 4°.

Les protéines sont dosées par la méthode pondérale, après précipi-

(1) Dans nos premiers travaux nous avons appelé l'index K « index granulopexique » ; nous préférons maintenant l'appeler index phagocytaire.

tation par l'acide trichloracétique à 20 p. 100, double lavage à l'acétone et séchage à 100° jusqu'à poids constant.

b) IODATION DU C. A. G. AVEC DES QUANTITÉS VARIABLES D'IODE CONTENANT DU ^{131}I . — Composition des solutions utilisées :

1° Na^{131}I contenant 1-2 millicuries dans 1-2 ml de solution physiologique à 9 p. 1 000 ;

2° Tampon au carbonate à pH 10 ;

3° Solution de KI_3 contenant 11,9 g de I_2 et 22 g de KI pour 100 ml d' H_2O ;

4° Solution de KI_3 contenant 0,123 g de I_2 et 0,157 g de KI pour 100 ml d' H_2O .

Nous avons réalisé quatre degrés d'iodation du C. A. G. en ajoutant à 100 mg de C. A. G. les quantités suivantes d'une des solutions de KI_3 :

Iodation forte	0,22 ml de la solution 3
Iodation moyenne	5,3 ml de la solution 4
Iodation faible	1,33 ml de la solution 4
Iodation très faible	0,44 ml de la solution 4

Ces quantités sont ajoutées à 1-2 millicuries de Na^{131}I contenu dans 1-2 ml de solution physiologique. Le mélange est laissé au repos pendant quinze à vingt minutes et on l'ajoute goutte à goutte en agitant à 100 mg de C. A. G. préalablement additionné de 0,92 ml de tampon carbonate. Cette opération est effectuée à 4° C.

On laisse le mélange à 4° pendant trois heures dans le cas de l'iodation forte et pendant une heure dans les autres cas. Ensuite on dialyse contre de la solution physiologique à 9 p. 1 000 à pH 7 jusqu'à ce que le liquide extérieur ne contienne que des quantités négligeables de radioactivité.

Dans le cas de l'iodation forte, on dialyse d'abord contre une solution de KI à 7 p. 1 000 pendant douze heures et ensuite contre la solution physiologique. En dosant la radioactivité du produit avant et après dialyse et en mesurant les volumes correspondants du mélange, on peut calculer le pourcentage de la radioactivité fixée sur la protéine. Cela permet de calculer la quantité d'iode fixée sur le C. A. G. en considérant que le ^{131}I est uniformément distribué dans la totalité de l'iode contenue dans la solution KI_3 utilisée.

La quantité d'iode fixée sur la protéine pour un même degré d'iodation peut varier sensiblement d'une préparation à l'autre. Dans chaque expérience nous indiquerons le degré de iodation obtenu en l'exprimant en milligrammes d'iode pour 100 mg de protéine.

c) TECHNIQUE DE DOSAGE DU C. A. G. MARQUÉ AU ^{131}I DANS LE SANG ET DANS LES ORGANES. — 1° *Dosage dans le sang*. — Dans le sang le ^{131}I est dosé par son rayonnement β au compteur de Geiger-Müller.

Le sang est prélevé par ponction du plexus rétro-orbitaire à des temps variables après l'injection du C. A. G. A chaque prélèvement une quantité de sang de 0,025 ou 0,050 ml est régulièrement distribuée sur un disque de papier filtre de 2,5 cm de diamètre. Après

séchage à la température du laboratoire, on mesure la radioactivité des disques de papier directement au compteur de Geiger-Müller.

Avec la même technique on mesure la radioactivité du C. A. G. lors de sa préparation avant et après la dialyse.

2° *Dosage dans les organes.* — Pour les organes, le ^{131}I a été dosé par son rayonnement γ au compteur à scintillation dans l'organe entier ou dans une fraction de l'organe préalablement pesé. L'émission de rayonnement γ du C. A. G. marqué au ^{131}I a été également mesurée au compteur à scintillation en plaçant une quantité connue de C. A. G. dans une cuve en verre.

Pendant toutes ces mesures, la distance entre l'échantillon et le tube a été maintenue toujours constante.

d) *EXPLORATION DE L'ACTIVITÉ PHAGOCYTAIRE DU S. R. E. A L'AIDE DU CARBONE COLLOÏDAL.* — La technique a été décrite dans nos travaux précédents [3, 5, 6].

RÉSULTATS.

1° *Cinétique de l'épuration sanguine chez la souris du C. A. G. de lapin contenant des quantités variables d'iode.* — Nous avons préparé deux lots de C. A. G. de lapin : l'un iodé avec la technique d'iodation forte contenait 8,3 mg d'iode p. 100 et l'autre avec la technique d'iodation faible contenait 0,36 mg d'iode p. 100.

Les deux produits ont été injectés par voie veineuse à deux lots de 5 souris à la dose de 2,5 mg pour 100 g. La figure 1 représente les courbes de l'épuration sanguine pour les deux produits étudiés. Les résultats sont exprimés comme moyenne des observations, en posant en ordonnée le logarithme du pourcentage dans le sang de la quantité de radioactivité et en abscisse les temps des prélèvements sanguins après l'injection. Les pourcentages ont été calculés par rapport à la valeur de la radioactivité sanguine extrapolée au temps 0.

L'examen des résultats rapportés dans la figure 1 montre que l'épuration sanguine de la radioactivité ne se fait pas suivant une fonction exponentielle du temps, car les courbes *a* et *a*₁ ne sont pas des droites. Cela est dû au fait qu'il reste une quantité résiduelle de radioactivité dans le sang à la fin de l'expérience. Cette quantité, calculée en pourcentage de la radioactivité au temps 0, n'est pas la même pour les deux produits injectés.

Pour le C. A. G. contenant 8,3 p. 100 d'iode il reste dans le sang 6 p. 100, et pour le C. A. G. contenant 0,36 p. 100 d'iode il reste dans le sang 16 p. 100 de la radioactivité initiale. En soustrayant ces quantités résiduelles à chaque point de leur courbe correspondante, nous obtenons une épuration qui suit une fonction exponentielle du temps et elle est représentée par les courbes *b*

et b_1 . Avec les valeurs des courbes b et b_1 on peut calculer l'index phagocytaire K suivant la formule antérieurement établie [3] :

$$\frac{\log C t - \log C t_1}{t_1 - t} = K$$

$C t$ = concentration sanguine au temps t .

$C t_1$ = concentration sanguine au temps t_1 .

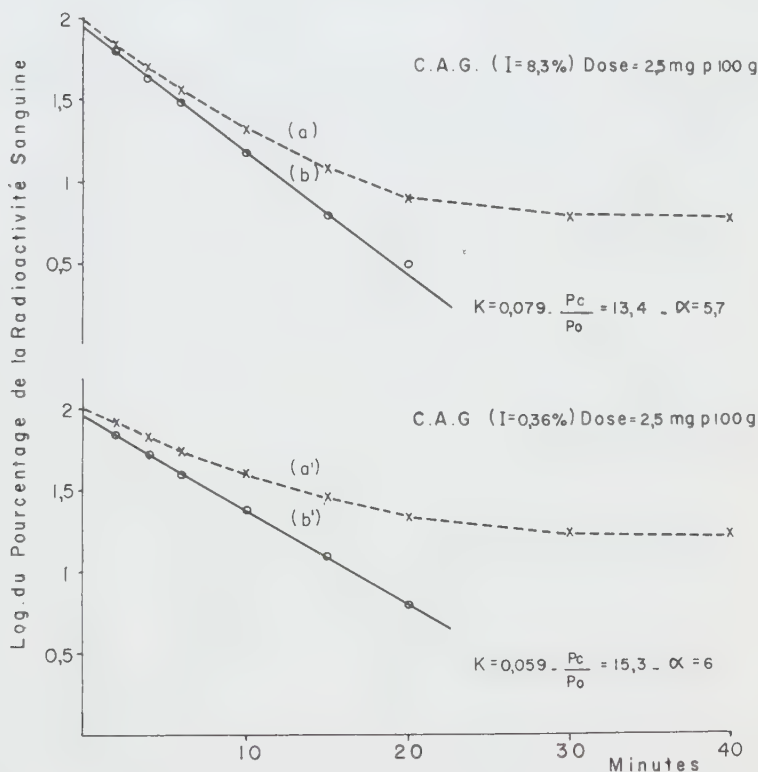


Fig. 1. — Cinétique de l'épuration sanguine chez la souris d'une dose de 2,5 mg pour 100 g de C. A. G. contenant soit 8,3 p. 100, soit 0,36 p. 100 d'iode (courbes a et a₁). Les courbes b et b₁ ont été tracées en soustrayant à chaque point la radioactivité sanguine résiduelle.

A la fin de l'expérience nous avons sacrifié les animaux et déterminé le rapport P_c/P_o et l'index phagocytaire corrigé d'après la formule :

$$\frac{P_c}{P_o} \sqrt[3]{K} = \alpha$$

Pc = poids du corps.

Po = poids des organes, foie et rate.

Les résultats obtenus montrent que les deux produits sont épurés du sang à la même vitesse, comme l'indiquent les valeurs des deux index phagocytaires corrigés α . Les différences des index K dans les deux groupes de souris sont dues à des différences relatives de la taille des organes (Pc/Po). En effet, si on calcule la valeur de l'index K dans le groupe des souris auxquelles on a injecté le C. A. G. iodé à 8,3 p. 100, pour une valeur du rapport Pc/Po = 15,3, on obtient $K = 0,053$.

Pour étudier la distribution de la radioactivité dans les organes chez les deux groupes de souris, nous avons sacrifié les animaux par section des carotides quarante minutes après l'injection du C. A. G., quand la quantité résiduelle de la radioactivité sanguine était devenue sensiblement constante, et nous avons alors mesuré la radioactivité des organes.

Dans le tableau I nous présentons les moyennes des résultats de cette expérience. Nous constatons que le C. A. G. iodé à 8,3 p. 100 est fixé en majeure partie dans le foie et la rate. Les autres organes ne contiennent que de faibles pourcentages de radioactivité qui peuvent être expliqués par la quantité résiduelle de la radioactivité sanguine. Le total de la radioactivité retrouvée dans les organes étudiés, additionné de la quantité sanguine résiduelle, est de 93,6 p. 100 de la dose injectée.

La distribution de la radioactivité dans les organes lors de l'injection du C. A. G. iodé à 0,36 p. 100 montre que, là aussi, le foie et la rate sont les plus riches en radioactivité. Cependant, la quantité retrouvée dans le foie est inférieure à celle obtenue avec le C. A. G. iodé à 8,3 p. 100. Ainsi avec le C. A. G. iodé à 0,36 p. 100 nous ne retrouvons dans les organes étudiés et le sang que 56,2 p. 100 de la radioactivité injectée.

Ces résultats nous montrent que les deux produits sont phagocytés par les cellules du S. R. E. à la même vitesse. Par contre, le C. A. G. iodé à 8,3 p. 100 laisse une quantité de radioactivité sanguine résiduelle plus faible que le C. A. G. iodé à 0,36 p. 100. En outre le pourcentage de la radioactivité retrouvée dans les organes est plus grand pour le C. A. G. plus fortement iodé. D'autres résultats que nous publierons ultérieurement montrent que ces complexes protéiniques, après leur accumulation dans les cellules du S. R. E., sont disloqués très rapidement et le ^{131}I revient dans la circulation pour être en grande partie éliminé par le rein.

Les deux produits étudiés dans le présent travail contiennent des quantités variables d'iode non radioactif mais des quantités sensiblement égales de ^{131}I . Les résultats expérimentaux montrent qu'après la fixation du C. A. G. dans les cellules, la libération

du ^{131}I et son passage dans la circulation sont plus importants pour le C. A. G. contenant un rapport $\text{I}/^{131}\text{I}$ plus faible.

Les quantités de radioactivité inférieures retrouvées dans le foie lors de l'injection du C. A. G. iodé à 0,36 p. 100 seraient donc dues à la libération d'une certaine quantité de ^{131}I pendant les

TABLEAU I. — Distribution de la radioactivité dans les organes de la souris à laquelle on a injecté 2,5 mg pour 100 g de C. A. G. de lapin contenant soit 8,3 p. 100, soit 0,36 p. 100 d'iode.

C.A.G. de lapin - Iodation 8,3 %

Poids moyen des 5 souris : 19,4 g

Organe	Poids moyen de l'organe en g	Pourcentage de la radioactivité injectée	
		par g d'organe	dans l'organe entier
Foie	1,300	64	83
Rate	0,179	14,5	2,6
Reins	0,230	5,6	1,3
Poumons	0,156	4,5	0,7
Muscle	0,220	0,8	
Pourcentage de la radioactivité restant dans le sang			6
			Total 93,6
C.A.G. de lapin - Iodation 0,36 %			
Poids moyen des 5 souris : 18 g			
Organe	Poids moyen de l'organe en g	Pourcentage de la radioactivité injectée	
		par g d'organe	dans l'organe entier
Foie	1,050	33,3	35
Rate	0,126	15,9	2
Reins	0,245	8,2	2
Poumons	0,174	7	1,2
Muscle	0,236	3	
Pourcentage de radioactivité restant dans le sang			16
			Total 56,2

quarante minutes qui s'écoulent entre l'injection du C. A. G. et le prélèvement des organes pour le dosage. Cette libération de ^{131}I est moindre pour le C. A. G. contenant 8,3 p. 100 d'iode.

Par l'injection de doses très petites de C. A. G., de l'ordre de 50 μg pour 100 g dont l'épuration sanguine ne prend que quelques minutes, nous avons trouvé que la libération du ^{131}I est négligeable et on retrouve dans le foie environ 100 p. 100 de la radio-

activité injectée aussi bien avec le complexe faiblement iodé qu'avec le complexe fortement iodé.

2° *Cinétique de l'épuration sanguine du C. A. G. humain contenant des quantités variables d'iode.* — Nous avons iodé quatre lots de C. A. G. préparé à partir de sérum humain avec les méthodes de iodation forte, moyenne, faible et très faible (voir technique). Ces produits ont été injectés à des lots de souris à la dose de 5 mg pour 100 g.

Dans le tableau II sont rapportées les valeurs moyennes des index K, α et Pc/Po, obtenues pour chaque groupe de souris. L'index K a été obtenu en soustrayant à chaque point de la courbe la quantité de radioactivité sanguine résiduelle, comme dans la figure 1.

TABLEAU II. — Cinétique de l'épuration sanguine du C. A. G. humain contenant différents pourcentages d'iode, exprimée par les index K et α pour la dose de 5 mg pour 100 g chez la souris.

C.A.G. humain - Dose : 5 mg p. 100 g

Méthode de Iodation	Quantité d'Iode pour 100 g de C.A.G.	Nombre d'animaux	K	PK	α	Radio-activité sanguine résiduelle
forte	4,9	6	0.049	18	6,6	6 %
moyenne	2,6	4	0.048	16,5	6,0	14 %
faible	0,36	7	0.045	18,3	6,5	20 %
très faible	0,02	2	0.033	17,7	5,7	13 %

Nous avons constaté que les différentes teneurs en iode du C. A. G. n'influencent pas sensiblement la vitesse de phagocytose du produit. Pour le C. A. G. humain comme pour celui de lapin, le produit le plus fortement iodé laisse une quantité de radioactivité sanguine résiduelle plus faible que les produits moins iodés.

3° *Etude de l'épuration sanguine chez la souris des globulines sériques de cheval contenant des quantités variables d'iode.* — Nous avons isolé la fraction globulinique des globulines du sérum normal de cheval d'après la méthode suivante. On ajoute à 100 ml de sérum de cheval 50 ml d'eau distillée, puis on ajoute par fractions successives 150 ml d'une solution saturée de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. On laisse trente minutes à la glacière, puis le précipité est lavé avec une solution de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à demi-saturation. On dissout le précipité dans de l'eau distillée et on dialyse contre du sérum physiologique à 9 p. 1 000 à pH 7,2 jusqu'à élimination complète du

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Les globulines sont dosées avec la même technique pondérale employée pour le C. A. G.

Les globulines obtenues ont été iodées faiblement ou fortement suivant les méthodes décrites pour le C. A. G.

Nous avons ainsi obtenu deux préparations de globulines sériques de cheval, l'une contenant 0,27 p. 100 et l'autre 6,9 p. 100

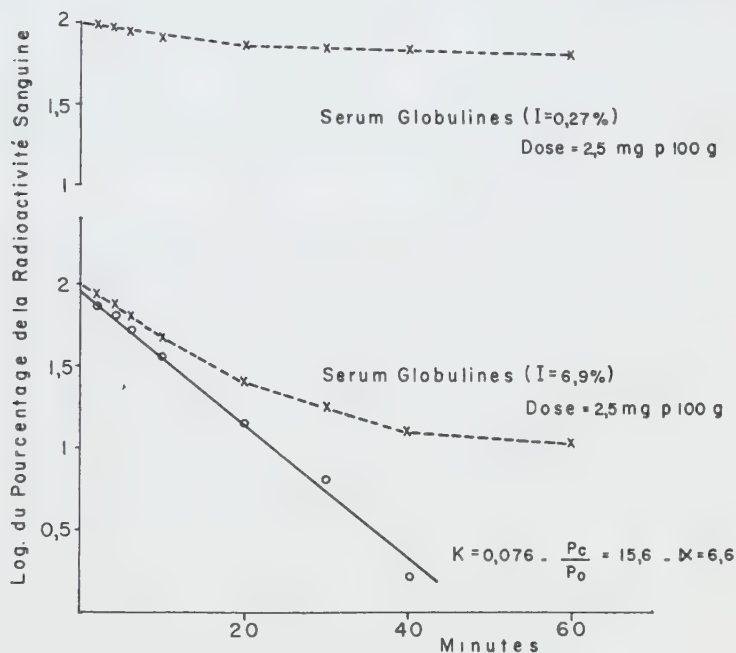


FIG. 2 — Cinétique de l'épuration sanguine chez la souris d'une dose de 2,5 mg pour 100 g de globulines sériques de cheval contenant soit 0,27 p. 100, soit 6,9 p. 100 d'iode.

d'iode, et renfermant des quantités semblables de ^{131}I . Ces produits ont été injectés par voie veineuse à deux groupes de 5 souris.

Nous présentons dans la figure 2 les courbes moyennes des épurations sanguines des globulines suivant le même procédé graphique que celui utilisé dans la figure 1.

Nous avons observé que les globulines iodées à 0,27 p. 100 sont éliminées très lentement du sang. Une heure après l'injection il reste encore dans le sang 63 p. 100 de la radioactivité initiale. Par contre, les globulines iodées à 6,9 p. 100 sont épurées du sang à une vitesse identique à celle du C. A. G. Une heure après l'injection il reste une quantité résiduelle de radioactivité sanguine

de 11 p. 100 du taux initial. En soustrayant cette quantité à chaque point de la courbe on obtient une épuration sanguine qui est une fonction exponentielle du temps. L'index K pour les globulines fortement iodées est sensiblement égal à celui observé pour le C. A. G. de lapin.

Il existe une grande différence dans la distribution de la radioactivité dans les organes, suivant qu'il s'agit des globulines iodées fortement ou faiblement. Les résultats obtenus sont reportés comme valeurs moyennes dans le tableau III.

TABLEAU III. — Distribution de la radioactivité dans les organes de la souris à laquelle on a injecté 2,5 mg pour 100 g de globulines sériques de cheval contenant 0,27 ou 6,9 p. 100 d'iode.

Globulines de cheval - Iodation : 0,27 %

Poids moyen des 5 souris : 18,5 g

Organe	Poids moyen de l'organe en g	Pourcentage de la radioactivité injectée	
		par g d'organe	dans l'organe entier
Foie	1,025	10,1	10,4
Rate	0,080	5,1	0,4
Reins	0,250	7,6	1,9
Poumons	0,165	15,1	2,5
Muscle	0,208	1,9	
Pourcentage de la radioactivité restée dans le sang			63
			Total 78,2

Globulines de cheval - Iodation : 6,9 %

Poids moyen des 5 souris : 19,7

Organe	Poids moyen de l'organe en g	Pourcentage de la radioactivité injectée	
		par g d'organe	dans l'organe entier
Foie	1,154	38,3	44,2
Rate	0,108	10,2	1,1
Reins	0,264	8	2,1
Poumons	0,155	3,9	0,6
Muscle	0,154	1,9	
Pourcentage de la radioactivité restée dans le sang			11
			Total 59

Pour les globulines contenant 0,27 p. 100 d'iode, on n'observe aucune fixation préférentielle dans le foie et la rate. De tous les organes étudiés, le plus riche en radioactivité est le poumon. Il faut remarquer qu'au moment du dosage, le sang circulant contenait une forte quantité de radioactivité.

La distribution dans les organes des globulines iodées à 6,9 p. 100 est très différente, et se rapproche sensiblement de celle observée pour le C. A. G. de lapin iodé faiblement. Le foie et la rate fixent une quantité de radioactivité supérieure à celle des autres organes étudiés. Pour les globulines iodées à 6,9 p. 100 il se produit, tout comme pour le C. A. G. iodé à 0,36 p. 100, une libération du ^{131}I à partir des organes et son retour dans la circulation dans les soixante minutes qui suivent l'injection. Cela est montré par l'étude des doses de 50 μg de globulines de cheval iodées à 6,9 p. 100 injectées à la souris. L'épuration sanguine de cette petite dose est terminée en moins de dix minutes et on retrouve dans le foie et la rate 88 p. 100 de la radioactivité injectée.

Les résultats obtenus nous montrent que les globulines sériques sur lesquelles on a fixé de fortes quantités d'iode sont phagocytées par les cellules du S. R. E. Une confirmation de ce fait sera rapportée dans la deuxième partie de ce travail, où nous étudions les phénomènes d'interférence causés par ces produits sur la phagocytose de particules de carbone.

4° *Etude de la cinétique de l'épuration sanguine chez la souris de petites quantités de C. A. G. humain iodé.* — Une caractéristique fondamentale de l'épuration sanguine des substances phagocytées par les cellules du S. R. E. est que leur vitesse d'épuration exprimée par l'index phagocytaire K est inversement proportionnelle à la dose injectée de façon que $K \cdot D = \text{cte}$. Cette relation, qui a été vérifiée pour plusieurs substances [2, 4, 7], doit avoir théoriquement des limites physiologiques. En effet, en diminuant la dose du colloïde injecté, la vitesse de son épuration sanguine ne pourra pas dépasser un maximum, conditionné par la quantité de sang qui passe à travers le territoire hépato-splénique dans l'unité de temps.

La sensibilité du dosage du C. A. G. marqué au ^{131}I nous a permis de vérifier cette hypothèse et d'établir la dose limite inférieure jusqu'à laquelle le rapport $K \cdot D = \text{cte}$ est valable.

Nous avons préparé un lot de C. A. G. à partir du sérum humain, iodé avec la méthode forte contenant 5 p. 100 d'iode. La quantité de ^{131}I a été augmentée pour permettre la mesure des faibles doses de C. A. G. Ce produit a été injecté à des lots de souris à des doses de 0,25, 0,50, 1, 2,5, 5 et 10 mg pour 100 g.

Nous avons calculé la moyenne des index phagocytaires K pour chaque dose. Les calculs ont été faits en soustrayant systématiquement la quantité de radioactivité sanguine résiduelle qui dans ce cas était de 6 p. 100.

Les résultats de cette expérience sont rapportés dans le tableau IV. Pour les doses supérieures à 0,5 mg pour 100 g

l'index K a été corrigé, en considérant une valeur constante de P_c/P_o proche de celle observée chez les souris injectées avec les doses de 0,5 et 0,25 mg pour 100 g. Ce calcul peut être effectué d'après la formule :

$$\frac{P_c}{P_o} \sqrt[3]{K} = \alpha$$

comme cela a été montré dans nos précédents travaux [3, 8].

TABLEAU IV. — Cinétique de l'épuration sanguine du C. A. G. humain contenant 5 p. 100 d'iode exprimée par l'index K, en fonction de la dose injectée chez la souris.

Dose en mg p. 100 g	Nombre de souris	K	P_c/P_o	K x Dose
0,25	4	0,340	16,5	0,085
0,5	3	0,230	16,2	0,115
1	2	0,300	16,3	0,300
2,5	3	0,100	16,3	0,250
5	3	0,057	16,3	0,284
10	3	0,026	16,3	0,260
				Moyenne 0,274

Les résultats obtenus nous montrent que la relation $K.D = cte$ est respectée pour des doses de C. A. G. supérieures à 0,5 mg pour 100 g. Pour des doses égales ou inférieures à 0,5 mg pour 100 g cette relation n'est plus vérifiée et la vitesse d'épuration sanguine tend à devenir indépendante de la dose injectée et à assumer une valeur maximum constante.

5° *Etude du pouvoir antigénique du C. A. G. homologue faiblement iodé chez le cobaye.* — Nous avons préparé un lot de C. A. G. à partir du sérum de cobaye et nous l'avons iodé avec la méthode d'iodation faible. Le C. A. G. contenait 0,38 p. 100 d'iode.

Nous avons injecté trois différentes doses de ce produit à trois groupes de cobayes et nous avons étudié l'épuration sanguine de la radioactivité suivant les techniques décrites. Le C. A. G. laissait une quantité de radioactivité sanguine résiduelle de 19 p. 100. Nous avons calculé l'index phagocytaire K pour chaque animal. Dix-huit jours après nous avons répété la même expérience chez les mêmes animaux. Les moyennes des résultats sont présentées dans le tableau V.

Nous n'avons remarqué aucun symptôme de sensibilisation anaphylactique chez les cobayes lors de la deuxième injection de C. A. G. Nous avons d'autre part essayé de provoquer le phénomène de Schultz-Dale et avons obtenu des résultats négatifs. Nous

devons conclure que la fixation sur le C. A. G. homologue de quantités d'iode aussi faibles ne le rend pas antigénique pour le cobaye. De plus, l'étude de l'index phagocytaire K ne montre pas de variations significatives lors de la première et de la deuxième injection. Pour ce produit également, la valeur de l'index K est inversement proportionnelle à la dose de C. A. G. injectée.

TABLEAU V. — Cinétique de l'épuration sanguine du C. A. G. homologue contenant 0,38 p. 100 d'iode chez le cobaye, mesurée deux fois à dix-huit jours d'intervalle.

Dose du C.A.G. en mg p. 100 g	Nombre d'animaux	K	K après 18 jours
0,87	4	0,170	0,150
1,55	4	0,111	0,096
3,1	4	0,050	0,052

Avec le même C. A. G. de cobaye contenant 0,38 p. 100 d'iode, nous avons réalisé une expérience analogue chez le rat.

Nous avons injecté à deux groupes de rats des doses de 1,2 et 4 mg pour 100 g de C. A. G. Vingt jours après, les mêmes animaux ont reçu les mêmes doses de ce C. A. G. Les valeurs de l'index phagocytaire K établies pour chaque groupe d'animaux ne présentent pas de variations entre la première et la deuxième injection.

Cinq jours après la dernière injection de C. A. G., nous avons mesuré le pouvoir phagocytaire du S. R. E. chez ces animaux avec la dose de 8 mg de carbone pour 100 g. Les valeurs des index K, Pc/Po et α ont été trouvées normales.

On peut en conclure que les doses de C. A. G. utilisées pour le test ne provoquent pas de variations de l'activité phagocytaire du S. R. E.

ETUDE DE LA PHAGOCYTOSE PRÉFÉRENTIELLE.

Contrôle de la méthode utilisée. — Nous avons montré précédemment [2] que l'injection par voie veineuse de C. A. G., au cours de l'épuration sanguine de particules de carbone, ralentit la vitesse de phagocytose de ces dernières. Ceci s'explique par l'effet compétitif, exercé par les particules de C. A. G. sur la

phagocytose des granules de carbone par les cellules réticulo-endothéliales.

Si nous injectons une dose fixe de carbone et mesurons la valeur de l'index K pour l'épuration de ce carbone, avant et après l'injection de C. A. G., nous pourrions établir un rapport K_1/K_2 (K_1 = index phagocytaire avant l'injection du C. A. G.) (K_2 = index phagocytaire après l'injection du C. A. G.) qui mesurera cet effet compétitif.

Nous avons d'abord vérifié que cet effet était indépendant de la concentration sanguine du carbone au moment de l'injection du C. A. G. pour une dose donnée de carbone. Dans ce but, nous avons injecté à 8 souris une dose de carbone de 16 mg pour 100 g. L'injection d'une dose de 30 mg de C. A. G. de lapin pour 100 g a été pratiquée à 4 souris avant la dixième minute et aux 4 autres après la vingtième minute suivant l'injection de carbone. Les moyennes des résultats de cette expérience sont rapportées dans le tableau VI.

TABLEAU VI. — Interférence exercée par 30 mg de C. A. G. de lapin pour 100 g sur l'épuration sanguine d'une dose de 16 mg de carbone pour 100 g lorsque l'injection du C. A. G. est faite à différentes concentrations sanguines de carbone.

K_1	K_2	K_1/K_2	C. A. G. injecté	Concentration sanguine du carbone en mg p. 100 ml au moment de l'injection du C. A. G.
0,014	0,0037	3,8	avant la 10ème minute	135
0,018	0,0053	3,4	après la 20ème minute	71

On peut constater que la valeur du rapport K_1/K_2 est sensiblement la même dans les deux lots de souris, bien que la concentration sanguine des particules de carbone au moment de l'injection de C. A. G. soit différente.

Cette technique nous permet de mesurer quantitativement le degré de phagocytose préférentielle des particules de nature différente, quand elles sont offertes en même temps à la cellule phagocytaire.

L'effet d'interférence, causée par l'injection de C. A. G. sur la phagocytose, ne s'exerce que pendant le temps où le C. A. G. circule dans le sang. Ce temps sera d'autant plus court que la dose de C. A. G. injectée est plus faible. Dans la figure 3 nous présentons des courbes typiques, obtenues chez des souris aux-

quelles on injecte, en cours d'élimination d'une dose de carbone de 16 mg pour 100 g, des quantités variables de C. A. G. de lapin iodé fortement.

Dans le cas de l'injection de 30 mg de C. A. G. iodé pour 100 g, le ralentissement de l'épuration des particules de carbone se prolonge pendant plus d'une heure, tandis que la dose de 1,5 mg pour 100 g du même produit ne provoque qu'un effet d'environ vingt minutes seulement ; ensuite la phagocytose des

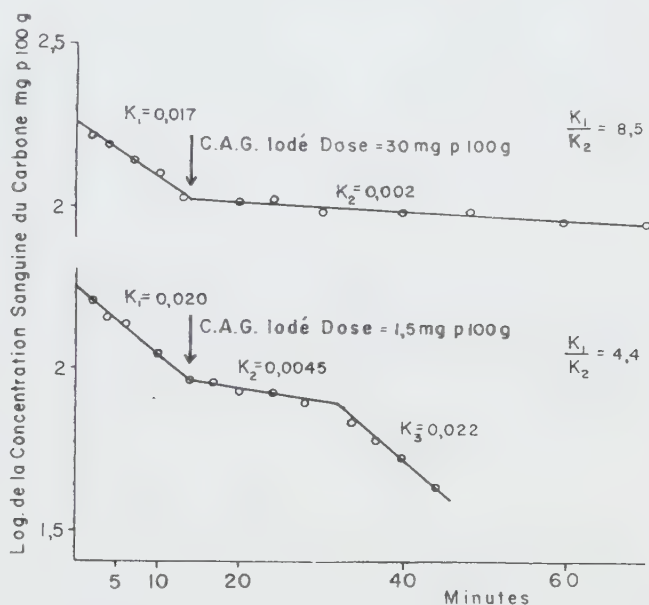


FIG. 3. — Effet de l'injection de différentes doses de C. A. G. humain iodé à 5 p. 100 sur la vitesse d'épuration d'une dose de 16 mg pour 100 g de carbone chez la souris. Le rapport K_1/K_2 mesure le degré d'interférence exercée par le C. A. G. sur la phagocytose du carbone.

particules de carbone reprend à la vitesse initiale. Cela indique que cette dose de C. A. G. injectée est éliminée de la circulation en vingt minutes environ.

Nous constatons également que la valeur du rapport K_1/K_2 augmente avec la dose de C. A. G., sans qu'il y ait de relation proportionnelle. En augmentant de vingt fois la dose de C. A. G., on observe que le rapport K_1/K_2 passe environ du simple au double.

Influence du degré d'iodation du C. A. G. sur son effet compétitif envers la phagocytose des particules de carbone chez la

souris. — Nous avons iodé une préparation de C. A. G. de lapin avec les méthodes de iodation faible et forte et avec une quantité du mélange KI_3 cinq fois plus grande que celle utilisée dans la méthode forte. L'iodation du C. A. G. a été faite suivant la technique précédemment décrite mais sans addition de ^{131}I .

Nous avons injecté à des lots de souris mâles de 19 à 25 g une dose de 16 mg de carbone pour 100 g de poids corporel, et nous avons déterminé l'index K_1 pour la phagocytose de ces particules de carbone pendant les dix à douze minutes qui suivent l'injection. Entre la douzième et la seizième minute nous avons injecté par voie veineuse des quantités variables de C. A. G. non iodé ou iodé à différents degrés, et nous avons à nouveau déterminé l'index phagocytaire K_2 pour la phagocytose des particules de carbone. Nous avons établi le rapport K_1/K_2 qui mesure le degré d'interférence causé par la phagocytose du C. A. G. sur la phagocytose des particules de carbone. Nous présentons les résultats obtenus dans le tableau VII.

TABLEAU VII. — Interférence sur la vitesse de phagocytose d'une dose de carbone de 16 mg pour 100 g exercée par le C. A. G. de lapin non iodé et iodé à différents degrés.

L'injection du C. A. G. a été pratiquée entre la douzième et la seizième minute après l'injection du carbone.

Méthode de Iodation	Dose de C.A.G. en mg p. 100 g	Nombre de souris	K_1	K_2	K_1/K_2
non iodé	30	7	0,016	0,0049	3,3
	5	7	0,016	0,0057	2,8
Iodation faible	30	6	0,015	0,0037	4
	5	6	0,018	0,0066	2,7
Iodation forte	30	6	0,020	0,0023	8,7
	5	8	0,016	0,0032	5
Iodation avec 5 fois plus d'Iode que dans l'iodation forte	5	4	0,020	0,0035	5,7

Nous constatons d'abord que le rapport K_1/K_2 pour chaque produit étudié ne varie pas proportionnellement avec la dose de C. A. G. injectée. Le degré d'interférence provoqué par le C. A. G. non iodé sur la phagocytose des particules de carbone est sensiblement égal à celui obtenu avec le C. A. G. iodé par la méthode faible. Par contre, le C. A. G. iodé avec la méthode forte provoque un ralentissement de la vitesse de phagocytose des particules de carbone qui est nettement plus important. En effet, la

valeur du rapport K_1/K_2 est environ le double de celle observée avec des doses correspondantes de C. A. G. non iodé ou iodé faiblement.

Le degré d'interférence du C. A. G. iodé avec la méthode forte n'est pas augmenté en iodant le C. A. G. avec une quantité d'iode cinq fois plus grande (il est possible que la méthode d'iodation forte fixe à la protéine une quantité d'iode qui atteint déjà le maximum et ne peut pas être dépassée par une addition d'iode plus importante).

Il résulte de ces expériences que, par la fixation d'une quantité suffisante d'iode sur le C. A. G., celui-ci est phagocyté de préférence au même produit non iodé ou iodé faiblement.

Influence du degré d'iodation des globulines sériques de cheval sur leur effet compétitif envers la phagocytose des particules de carbone chez la souris. — Nous avons étudié l'effet compétitif des globulines sériques de cheval iodées ou non iodées sur la phagocytose des particules de carbone, avec la même méthode que celle utilisée pour le C. A. G.

Les globulines sériques ont été iodées par la méthode d'iodation faible, moyenne et forte. Nous les avons injectées, par voie veineuse, à des souris entre la douzième et la seizième minute après l'injection d'une dose de 16 mg de carbone pour 100 g. Les moyennes des valeurs des index phagocytaires K_1 et K_2 sont rapportées dans le tableau VIII.

Nous constatons que les globulines sériques de cheval non iodées n'exercent aucun effet compétitif sur la phagocytose des

TABLEAU VIII. — Interférence sur la vitesse de phagocytose d'une dose de carbone de 16 mg pour 100 g exercée par les globulines sériques de cheval non iodées et iodées à différents degrés.

L'injection des globulines a été pratiquée entre la douzième et la seizième minute après l'injection du carbone.

Méthode de Iodation	Dose de sérum-globulines en mg p. 100 g	Nombre de souris	K_1	K_2	K_1/K_2
non iodé	30	5	0,018	0,018	1
Iodation faible	30	5	0,017	0,013	1,3
Iodation moyenne	20	4	0,031	0,010	3,1
Iodation forte	30	6	0,0195	0,005	3,9
	5	3	0,0125	0,0037	3,4

particules de carbone, car la valeur de K_1 est égale à la valeur de K_2 . Les globulines sériques iodées faiblement ont un très léger effet compétitif qui est à la limite de la sensibilité de la méthode utilisée. Par contre, la phagocytose des globulines sériques iodées avec les méthodes de iodation moyenne et forte interfère très nettement avec la phagocytose des particules de carbone.

Ces résultats nous montrent que la fixation d'une quantité d'iode suffisante confère aux sérum-globulines de cheval la propriété d'interférer avec la phagocytose de particules de carbone, tandis que le même produit non iodé est dépourvu de toute action.

DISCUSSION.

L'étude de l'épuration sanguine du C. A. G. de lapin et humain contenant des quantités variables d'iode nous a montré que le degré d'iodation n'influence pas la vitesse à laquelle le produit est phagocyté par les cellules du S. R. E. Cela indique aussi que la méthode d'iodation n'a pas sensiblement changé l'état de dispersion des particules du C. A. G. Dans un article précédent [2] concernant l'épuration sanguine du C. A. G. iodé fortement, nous n'avions pas observé l'existence d'une quantité de radioactivité résiduelle. Pour cette préparation, elle est généralement assez faible (inférieure à 6 p. 100) et nous n'avons pas toujours poursuivi les dosages jusqu'à atteindre ce niveau. Les dosages de la radioactivité dans les organes et une étude histologique, qui sera rapportée en détail dans un travail ultérieur, nous montrent que le C. A. G. iodé ou non est accumulé dans les cellules de Kupffer du foie et dans les cellules réticulaires de la pulpe rouge de la rate. Si on injecte à l'animal par voie veineuse un mélange de particules de carbone et du complexe protéinique, on observe histologiquement une accumulation des deux produits dans les mêmes cellules du S. R. E. Ces observations constituent la vérification histologique des phénomènes de compétition exercée sur la phagocytose des particules de carbone par le C. A. G.

Le C. A. G., phagocyté par les cellules réticulo-endothéliales, est très rapidement attaqué par le système enzymatique du phagocyte et l'iode fixé est éliminé de la cellule et retourne dans la circulation sous une forme diffusible que le rein est capable d'éliminer.

L'existence dans le foie d'enzymes capables de détacher l'iode des protéines a déjà été démontrée [9, 10].

Les résultats que nous avons rapportés indiquent que le processus de libération de l'iode du C. A. G. est proportionnellement plus lent pour les produits fortement iodés. Nous n'avons pas

encore de renseignements sur les diverses étapes de ce phénomène ni sur la nature des produits qui quittent la cellule réticulo-endothéliale pour retourner dans la circulation.

Il est certain que la radioactivité sanguine résiduelle est liée en partie au moins à ce phénomène. Une autre partie de la radioactivité sanguine résiduelle pourrait être due à la présence dans le C. A. G. d'une faible fraction de protéines, non suffisamment modifiées par la chaleur pour être fixées par les cellules du S. R. E. Cette fraction deviendrait susceptible d'être phagocytée si une plus forte quantité d'iode était fixée sur elle. Les résultats fournis par l'étude du comportement des globulines sériques de cheval fortement iodées plaident en faveur de cette hypothèse. Nous observons, en effet, que les globulines sériques de cheval injectées à la souris sont épurées du sang d'une façon très différente, et leur distribution dans les organes varie suivant qu'elles sont faiblement ou fortement iodées. Nous n'avons pas de preuve que les globulines sériques iodées faiblement soient phagocytées par le S. R. E. hépato-splénique, car ces organes n'accumulent pas sélectivement le ^{131}I fixé sur elles. La radioactivité que l'on retrouve dans les organes est probablement due à la quantité de sang qu'ils contiennent.

Par contre, les globulines sériques fortement iodées sont éliminées rapidement de la circulation et accumulées sélectivement dans le foie et la rate. La fixation d'une forte quantité d'iode sur une protéine rendrait donc celle-ci apte à être phagocytée par les cellules du S. R. E., puisque la même protéine faiblement iodée ne l'est pas ou l'est beaucoup plus lentement. D'autres auteurs [41, 42] ont montré que la sérum-albumine, marquée au ^{131}I et injectée dans la circulation, a une vie moitié plus courte que celle qui contient des acides aminés marqués au ^{35}S .

L'étude des valeurs de l'index phagocytaire K lors de l'injection de quantités très faibles de C. A. G. iodé (tableau IV) nous permet d'établir la limite de validité de la relation qui existe entre l'index K et la dose de particules injectée. Il était à prévoir que la valeur de l'index K ne pourrait augmenter indéfiniment lorsqu'on diminue la dose de colloïde. Elle serait théoriquement limitée par le temps que mettrait la totalité du sang de l'animal à passer à travers le système hépato-splénique. Une étude détaillée de ce problème, qui fera l'objet d'une autre publication, nous a montré qu'il existe pour chaque colloïde une « dose limite » de particules, au-dessous de laquelle la vitesse d'épuration sanguine est constante pour une espèce animale donnée, indépendamment de la nature des particules injectées. Cela est dû au fait que les doses très faibles de particules sont épurées dans une proportion proche de 100 p. 100 à chaque passage à travers le foie. Ce fait a été mis en évidence par Dobson [13, 14] et

Brauer [45] pour les particules de phosphate de chrome. Ces résultats indiquent clairement que, pour pratiquer l'exploration de la fonction phagocytaire des cellules du S. R. E., il est nécessaire d'injecter une quantité de colloïde supérieure à la « dose limite ». Il faut que la dose de particules soit telle que l'équation $K.D = cte$ soit respectée. Pour des doses de colloïde plus faibles que la « dose limite », la vitesse d'épuration sanguine ne dépend plus de la capacité phagocytaire des cellules du S. R. E. mais de la quantité de sang qui traverse le territoire hépatosplénique. C'est pour cela que les méthodes d'exploration de la fonction phagocytaire du S. R. E. proposées par Gabrieli [46], Heller [47], Noller [48] sont critiquables du fait que les doses de particules de phosphate de chrome utilisées par ces auteurs sont inférieures à la « dose limite ».

Les résultats des expériences sur le pouvoir sensibilisant du C. A. G. homologue faiblement iodé nous permettent d'affirmer que la quantité d'iode fixée sur la protéine n'est pas suffisante pour rendre cette protéine antigénique. Nous avons aussi des preuves que les doses de C. A. G., utilisées pour le test de l'activité phagocytaire du S. R. E., n'altèrent pas la fonction de ce système cellulaire. Ces résultats nous indiquent que les complexes protéiniques homologues faiblement iodés pourraient être appliqués sans danger à l'étude du S. R. E. chez l'homme.

Les résultats de l'étude de la phagocytose préférentielle nous permettent de constater que les cellules réticulo-endothéliales sont pourvues d'un mécanisme de sélection envers des particules de différente nature. La valeur de l'index K_1/K_2 donne une mesure quantitative de l'avidité avec laquelle les cellules réticulo-endothéliales phagocytent les colloïdes.

Les résultats présentés par la figure 3 nous montrent que l'effet d'interférence du C. A. G. avec la phagocytose des particules de carbone se manifeste pendant le temps de circulation du produit. Quand la quantité de C. A. G. injectée est éliminée de la circulation, la phagocytose des granules de carbone reprend à la vitesse initiale. Une dose de 1,5 mg pour 100 g de C. A. G. de lapin fortement iodé interfère pendant vingt minutes avec la phagocytose des particules de carbone chez la souris. Les résultats de la vitesse de l'épuration sanguine du C. A. G. fortement iodé, rapportés dans la figure 1, permettent de calculer qu'une dose de 1,5 mg pour 100 g de ce produit est éliminée de la circulation presque entièrement en vingt minutes.

La durée de l'interférence avec la phagocytose des particules de carbone est d'autant plus longue que la dose de C. A. G. injectée est plus grande. Le degré d'interférence mesuré par le rapport K_1/K_2 n'est pas directement proportionnel à la dose de C. A. G. injectée. Cela indique que le C. A. G., même non iodé,

est phagocyté de préférence aux particules de carbone, car si les cellules fixaient indifféremment les deux produits, l'effet de compétition serait en rapport direct avec la quantité de C. A. G. injectée.

La vitesse de phagocytose n'est pas modifiée par le degré d'iodation du C. A. G. Par contre, la quantité d'iode fixée a un effet très net sur la préférence avec laquelle les particules de C. A. G. sont phagocytées par rapport au carbone (tableau VII).

Ces résultats confirment nos observations précédentes [2] sur la sélectivité de la phagocytose du C. A. G. fortement iodé, par rapport au même produit non iodé.

Nous n'avons pas de preuves que les globulines sériques de cheval iodées faiblement soient phagocytées par les cellules du S. R. E. hépato-splénique, car elles ne sont pas accumulées sélectivement dans ces organes et elles n'interfèrent pas avec la phagocytose des particules de carbone. La fixation d'une forte quantité d'iode sur les globulines sériques de cheval leur confère la propriété d'être phagocytées par les cellules du S. R. E., et en même temps celle d'interférer avec la phagocytose des particules de carbone.

Nous ne savons pas encore si la méthode d'iodation forte des globulines peut changer leurs caractères physiques de taille ou de dispersion, ou si leur différence de comportement dans l'organisme est provoquée uniquement par leur contenu en iode.

D'autres auteurs [19, 20] ont observé que la fixation d'iode dans les protéines sériques entraîne des modifications de leur comportement métabolique quand elles sont injectées à l'animal. L'étude des relations entre la nature physico-chimique des protéines et leur susceptibilité d'être phagocytées par les cellules du S. R. E. fournit de nouvelles méthodes d'investigation qui permettent d'approcher les mécanismes intimes de la fonction phagocytaire des cellules du S. R. E.

CONCLUSIONS.

1° Le complexe albumino-globulinique C. A. G. que l'on peut isoler du sérum chauffé est phagocyté par les cellules du S. R. E. La quantité d'iode fixée sur ce complexe entre 0,02 et 8,3 p. 100 n'influence pas la vitesse de phagocytose de ce produit. Par contre, le C. A. G. contenant de fortes quantités d'iode est phagocyté par les cellules du S. R. E. de préférence au même produit moins iodé.

2° Les globulines sériques de cheval faiblement iodées (0,27 p. 100) ne sont pas phagocytées par les cellules du S. R. E. et n'influencent pas l'épuration sanguine de particules de carbone. Par contre, les mêmes globulines fortement iodées (6,9 p. 100)

sont fixées par les cellules du S. R. E. et interfèrent avec la phagocytose des particules de carbone.

3° L'étude de la phagocytose de doses très faibles de C. A. G. nous a montré qu'il existe une « dose limite » au-dessous de laquelle la vitesse d'épuration sanguine n'est plus proportionnelle à la dose injectée et tend à devenir constante. Il en résulte que pour l'exploration de l'activité phagocytaire du S. R. E. il est nécessaire d'injecter une dose de colloïde telle que la relation $K \cdot D = cte$ soit vérifiée.

4° L'injection du C. A. G. homologue faiblement iodé (0,38 p. 100) à des doses exploratrices de l'activité phagocytaire du S. R. E. ne provoque pas de sensibilisation anaphylactique du cobaye et n'affecte pas la fonction phagocytaire ultérieure de ce système.

SUMMARY.

INFLUENCE OF QUANTITY OF IODINE FIXED ON NORMAL AND HEAT-MODIFIED SERUM-PROTEINS ON PHAGOCYTOSIS OF THESE COLLOIDS BY R. E. S. CELLS.

1° The Albumin Globulin Complex (C. A. G.) which can be isolated from heated serum is phagocytized by the cells of the R. E. S. Amounts of iodine linked to this protein complex, from 0,02 to 8,3 % do not modify the rate of phagocytosis of this substance, while C. A. G. containing large amounts of iodine is phagocytized preferentially to the less iodinated product by the R. E. cells.

2° Horse Serum Globulins weakly iodinated (0,27 %), are not phagocytized by the cells of the R. E. S. and do not interfere with the blood clearance of carbon particles. However, if these globulins are iodinated with 6,9 % iodine, they are absorbed by the R. E. cells and interfere with the phagocytosis of carbon particles.

3° The study of phagocytosis of very small doses of C. A. G. has shown that there is a critical dose of colloids below which the rate of clearance is no longer proportional to the injected dose and becomes constant. Therefore doses of colloids in the range where $K \times D = ct$ must be injected to explore the phagocytic activity of the R. E. S.

4° The injection of weakly iodinated homologous C. A. G. (0,38 %) to explore the phagocytic activity of the R. E. S. is not sensitizing to the guinea-pig and does not modify the phagocytic function explored subsequently.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] VAN DER SCHEER (J.), WYCKOFF (R. W.) et CLARK (F. L.). *J. Immunol.*, 1941, **40**, 39.
- [2] BENACERRAF (B.), HALPERN (B. N.), STIFFEL (C.), CRUCHAUD (S.) et BIOZZI (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 601.
- [3] BIOZZI (G.), BENACERRAF (B.) et HALPERN (B. N.). *Brit. J. exp. Path.*, 1953, **34**, 441.
- [4] HALPERN (B. N.), BENACERRAF (B.), BIOZZI (G.) et STIFFEL (C.). *Rev. Hématol.*, 1954, **9**, 621.
- [5] HALPERN (B. N.), BIOZZI (G.), MÈNE (G.) et BENACERRAF (B.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **80**, 582.
- [6] STIFFEL (C.), BENACERRAF (B.), BIOZZI (G.) et HALPERN (B. N.). *C. R. Soc. Biol.*, 1954, **148**, 318.
- [7] BENACERRAF (B.), STIFFEL (C.), BIOZZI (G.) et HALPERN (B. N.). *C. R. Soc. Biol.*, 1954, **148**, 486.
- [8] BIOZZI (G.), BENACERRAF (B.), STIFFEL (C.) et HALPERN (B. N.). *C. R. Soc. Biol.*, 1954, **148**, 431.
- [9] ROCHE (J.), JUTISZ (M.), LISSITZKY (S.) et MICHEL (R.). *Biochem. Biophys. Acta*, 1951, **7**, 257.
- [10] SPROTT (W. E.) et MAC LAGEN (M. F.). *Biochem. J.*, 1955, **59**, 288.
- [11] ARMSTRONG (S. H.), KUKRA (J.), HERSEMAN (J.), McLEOD (K.), WOLTER (H.) et BRONSKY (D.). *J. Lab. clin. Med.*, 1955, **45**, 51.
- [12] VOLWILER (W.), GOLDSWORTHY (P. D.), MAC MARTIN (M. P.), WOOD (P. A.), MAC KAY (J. R.), FREMONT-SMITH (K.) et SHOCK (D. F.). *J. clin. Invest.*, 1954, **33**, 970.
- [13] DOBSON (E. L.) et JONES (H. B.). *Acta med. scand.*, 1952, **144**, Sup. 273.
- [14] DOBSON (E. L.), WARNER (G. F.), FINNEY (C. R.) et JOHNSON (M. E.). *Circulation*, 1953, **7**, 690.
- [15] BRAUER (R. W.), LEONG (G. F.), Mc ELROY (R. F.) et HOLLOWAY (R. J.). *Am. J. Physiol.*, 1956, **184**, 593.
- [16] GABRIELI (E.). *Acta physiol. scand.*, 1951, **53**, 283.
- [17] HELLER (J. H.). *Endocrinology*, 1955, **56**, 80.
- [18] NOLLER (H. G.). *Communication I^{er} Symposium International sur la Physiopathologie du S. R. E.*, 1955..
- [19] MASOUREDIS (S. P.) et BEECKMANS (M. L.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1955, **89**, 398.
- [20] FRIEDBERG (W.), WALTER (M.) et HAUROWITZ (F.). *J. Immunol.*, 1955, **75**, 315.

ÉTUDE DES FORMES L DES BACTÉRIES APPARUES SPONTANÉMENT *IN VIVO*

II. CARACTÈRES PARTICULIERS DES ÉLÉMENTS GRANULAIRES

par J. VIGOUROUX et C. HANNOUN. (*)

(Institut Pasteur, Laboratoire de M^{lle} Cateigne,
Service de M. R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE)

Dans une première partie de nos recherches [2, 3, 11, 12], nous avons décrit l'évolution spontanée *in vivo*, d'une bactérie isolée d'une maladie humaine, vers des éléments différents de la forme originale et non décrits dans la bactériologie classique. Nous avons dit que ces éléments, analogues en une certaine mesure aux formes L, donnaient pendant leur évolution des formes intermédiaires instables, pouvant, grâce à des modifications de milieu, être transformées en formes plus avancées ou au contraire retourner vers la normale. Le terme apparent de cette évolution, que nous avons vu aussi avec des éléments provenant d'autres bactéries, est la phase que nous nommons « granulaire ». Cet élément, visible ou invisible au microscope optique selon la taille et qui pour le moment est appelé du nom peu satisfaisant de « granule », présente des caractères particulièrement intéressants du point de vue bactériologique, génétique et même pathologique.

Nous étudions ici la genèse de ces granules (ou ultraphytus), leur morphologie, leurs caractères de culture, leur évolution, leur résistance aux agents chimiques ou physiques, leur pouvoir pathogène et leur stabilisation à l'état de granule.

DÉCLENCHEMENT DE LA TRANSFORMATION.

Nous avons utilisé plusieurs sources de granules et plusieurs méthodes de déclenchement de la transformation. Tout d'abord les éléments, obtenus dans la première partie de ce travail [2, 12] par passage d'un streptocoque sur lapin et sur embryon de poulet, nous ont fourni des stades d'évolution (décrits sous les noms de formes B, C et D) riches en corps globuleux et en granules. Après avoir amené ces éléments, par repiquages

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 octobre 1956.

successifs, à un stade de dégradation maximum, nous les avons filtrés sur bougie L₃, obtenant ainsi des granules à l'état pur. D'autre part, en soumettant une culture normale à l'agitation avec des billes de verre pendant vingt minutes à vitesse moyenne, puis en filtrant, on obtient aussi des granules. La filtration de la culture normale sans agitation préalable donne également des éléments viables, mais en beaucoup plus faible quantité. Enfin, nous avons aussi utilisé la méthode classique en faisant agir sur le germe la pénicilline, en bouillon additionné de 20 p. 100 de sérum de cheval.

L'obtention de formes filtrables viables dans ces diverses conditions montre que les facteurs biologiques ou mécaniques peuvent, en provoquant peut-être la lyse des bactéries, libérer des sous-unités évolutives ayant conservé les caractères potentiels et génétiques de la bactérie normale : ces éléments peuvent soit se fixer sous cette forme, soit retourner à la bactérie dont ils sont issus. L'étude microscopique, soit après fixation et coloration, soit à l'examen en contraste de phase, montre que les granules proviennent vraisemblablement des corps globuleux. Quelle que soit la source choisie, l'évolution des granules est très comparable, avec de minimes différences que nous signalerons plus loin.

MORPHOLOGIE ET ÉVOLUTION DES GRANULES.

L'étude morphologique a été réalisée au microscope à contraste de phase et après coloration de Gram et de May-Grünwald-Giemsa.

Les granules jeunes apparaissent comme des particules rondes, de petite taille, à la limite de la visibilité au microscope ordinaire et fortement réfringentes. A la coloration de Gram, ils sont brillants et prennent mal les colorants. On les rencontre isolés ou inclus dans les corps globuleux et leur morphologie ne peut être bien définie à ce stade. En laissant les cultures à l'étuve à 37°, on peut constater que les granules se colorent de mieux en mieux, pour devenir fortement Gram positifs. D'autre part, au fur et à mesure que leur taille augmente, ils ont tendance à se transformer en petites masses de formes diverses, mais caractéristiques : triangulaires, ovalaires, en demi-lune et en anneaux. L'évolution morphologique est assez complexe, car on trouve souvent plusieurs formes simultanément, avec, le plus fréquemment, prédominance de l'une d'entre elles. Il existe probablement un cycle que nous ne pouvons encore décrire avec précision : les premiers stades sont certainement les granules ronds et identiques entre eux, les stades les plus évolués étant sans doute les formes annulaires ou ovalaires. Il est à noter que ces stades n'ont été observés qu'en culture chez des granules

libres et jamais dans les éléments intracellulaires ou dans les corps globuleux.

Dans les cas où l'évolution conduit au retour à la bactérie, les granules qui grossissent prennent l'une des dispositions que nous allons décrire et arrivent peu à peu à une taille et à une forme analogues à celle du germe normal. A partir de ce moment, le repiquage donne une culture typique en vingt-quatre heures. L'évolution correspondrait donc à une sorte de « maturation ». Au contraire, les repiquages effectués au cours de l'évolution montrent, soit, si l'inoculum est abondant, une continuation de l'évolution comme dans le tube qui a servi à ensemler, soit, si l'inoculum est réduit, un échec de la subculture. L'évolution ne correspondrait donc probablement pas à une multiplication des granules, mais à une transformation de granules préexistants.

Il existe un autre type d'évolution où les granules donnent naissance à des corps globuleux, lesquels se multiplient activement puis, achevant leur évolution, libèrent une grande quantité de granules. Dans ce cas, les granules augmentent en nombre, non en se multipliant, mais par l'intermédiaire des corps globuleux.

Dans d'autres cas enfin, les granules grossissent, la maturation semble échouer et ils peuvent présenter une taille largement supérieure à celle du germe normal, sans que celui-ci réapparaisse : on a alors des cultures de « granules géants » dont l'évolution n'aboutit pas.

L'évolution de la morphologie et de la taille des granules s'accompagne d'une évolution de leur disposition. Au début, les granules sont dispersés, puis, ils présentent plusieurs arrangements assez caractéristiques. L'un des plus fréquents est la disposition en réseaux de chaînettes fines et régulières. On observe aussi des amas de granules, denses au centre et de plus en plus lâches sur les bords. Enfin, les formes en demi-lune et en croissants se groupent souvent entre elles et avec les formes rondes, ovales ou même annulaires, pour donner des espèces de couronnes. Quelquefois, on voit une substance Gram négative apparaître autour des granules, qui semble les enrober. Elle prend d'abord faiblement la fuchsine, puis l'affinité tinctoriale augmente. On voit aussi, dans les préparations, des masses roses isolées dont nous ignorons le rapport avec la substance voisine des granules. Finalement, on observe une sorte de filament Gram négatif contenant un chapelet de granules Gram positifs. Ces formations évoluent le plus souvent en chaînettes de germes qui sont alors viables dans les conditions ordinaires.

L'évolution générale que nous venons de décrire est commune aux granules produits chez l'embryon de poulet et à ceux artifi-

ciellement provoqués *in vitro*. Nous n'avons observé, entre les deux, que de faibles différences. Les granules provenant de cultures normales évoluent plus lentement et aussi plus simplement ; ils donnent en général des chaînettes formant des réseaux sur lesquels, à la fin, apparaissent les germes. Au contraire, les granules provenant de formes L spontanées (obtenues chez l'embryon de poulet) donnent des cultures beaucoup plus polymorphes et tendent, en fin d'évolution, à rester aux stades intermédiaires des formes B (cocci en amas). Il faut les repiquer plus fréquemment pour retrouver le streptocoque normal. Dans les cas de retour à la forme initiale, l'identité du germe obtenu a été prouvée par l'emploi de sérum spécifique préparé avec la souche originale.

MILIEUX DE CULTURE.

Nous avons pu constater que les milieux liquides sont les plus propices à l'évolution des granules. En général, avant quatre jours d'incubation, il est très difficile de voir quoi que ce soit dans les milieux. En bouillon, les granules obtenus *in vitro* évoluent à peu près en quinze jours à l'étuve à 37°, pour aboutir à la forme normale. Ceux que l'on obtient *in ovo* ont une évolution plus rapide : moins de dix jours. Nous pensons que le vitellus est un excellent élément d'amélioration du bouillon, ce qui explique la diminution du temps d'évolution. Quelquefois, au quatrième ou sixième jour, un tube devient fortement dense et il apparaît un gros culot formé d'éléments non colorables par le Gram ou le Giemsa. Après quarante-huit heures, on voit une multitude de petits corps globuleux en voie de multiplication par bourgeonnement, qui se colorent d'abord faiblement en rose, et deviennent plus colorables par la suite. Deux jours plus tard on commence à discerner, à l'intérieur, de très petits granules qui grossissent rapidement. Les corps globuleux peuvent éclater en libérant leurs granules, mais dans d'autres cas l'évolution a lieu à l'intérieur, donnant finalement une chaînette normale ou un amas de cocci.

Quelques expériences préliminaires sur cultures de tissus (rein de singe) en présence d'antibiotiques nous ont permis d'obtenir la multiplication des granules et d'observer des images de granules intracellulaires. L'évolution est relativement rapide et aboutit morphologiquement à la bactérie normale ; cependant ces bactéries ne sont pas repiquables. Ceci montre que les antibiotiques présents dans le milieu n'empêchent pas l'évolution des granules, malgré la grande sensibilité de la bactérie originale, mais que celle-ci, aussitôt reconstituée, retrouve sa sensibilité et ne peut survivre.

NOTION DE POTENTIEL ÉVOLUTIF.

Nous avons observé que le passage d'œuf en œuf de granules venant de formes L filtrées en permettait la culture sans l'évolution vers la bactérie. C'est le seul cas où nous ayons eu la preuve de leur multiplication directe. Il y a donc, parmi les granules, des différences quant à leur capacité d'évoluer. Nous avons souvent noté le fait que tous les granules d'une culture ne sont pas capables d'évoluer. On peut estimer à 10 p. 100 environ la proportion des granules évolutifs : le reste se maintient sous la forme granulaire, ou disparaît. Ceci explique le résultat des repiquages négatifs. De même, les granules provenant de la filtration de cultures du germe normal n'évoluent que très lentement. Suivant l'origine, la capacité d'évolution, le *potentiel évolutif* varie donc largement. Il existe de nombreuses variétés intermédiaires entre ceux qui évoluent vite vers la bactérie normale et ceux qui, fixés, en sont incapables.

Les conséquences pratiques de cette notion sont importantes. Les granules fixés ou presque fixés ne pourront être isolés que par des techniques *in vivo*. Par contre, les granules à potentiel évolutif élevé pourront facilement être isolés *in vitro*, même à l'aide des méthodes bactériologiques habituelles, parfois simplement en prolongeant l'incubation ou en effectuant quelques repiquages.

INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE ET DES ANTIBIOTIQUES
SUR L'ÉVOLUTION.

Nous avons constaté que les granules peuvent évoluer dans de très larges limites de température. Des cultures laissées à la température ambiante et même à la glacière (4°) évoluent de la même façon et sensiblement aussi rapidement que les cultures témoins laissées à l'étuve à 37°. De plus, les granules résistent à la température de 52°, pendant de courts intervalles de temps.

Au cours d'essais sur les milieux de culture convenant à l'étude de l'évolution des granules, nous avons utilisé des cultures de tissu dans un milieu contenant des antibiotiques (pénicilline, 100 U. O./ml, streptomycine, 50 µg/ml) et nous avons déjà décrit les résultats obtenus.

Les antibiotiques n'inhibent pas l'évolution des formes granulaires vers la bactérie normale, mais empêchent la multiplication et le repiquage de celle-ci.

CONSTITUTION DES GRANULES.

Les examens microscopiques montrent, ainsi que nous l'avons dit, une structure simple chez les granules tout jeunes, mais les

formes plus évoluées sont plus compliquées et difficiles à interpréter. Parfois, on voit des images avec une zone fortement Gram+, complétée ou entourée d'une autre zone faiblement Gram—. Cette façon de fixer les colorants laisse déjà supposer l'existence de deux parties de composition différente. La coloration de Robinow colore les granules comme des noyaux bactériens. Par ailleurs, les cultures des granules font apparaître, près de la surface, des amas granuleux de substances adhérant au verre et ressemblant à des globules lipidiques. Enfin, le xylol, utilisé parfois pour ôter l'huile de cèdre sur nos lames, y dissout régulièrement les structures apparentées aux granules.

L'interprétation de ces résultats préliminaires confirme l'importance des acides nucléiques et des composés lipidiques dans le métabolisme et la constitution chimique des granules.

POUVOIR PATHOGÈNE.

Nous avons recherché le pouvoir pathogène de granules de deux origines : soit cultures riches en corps globuleux et en granules provenant de transformation *in vivo*, soit cultures agitées. Après filtration sur bougie L₃, le matériel était inoculé soit par voie vitelline (0,5 ml, embryons de 6 jours), soit sur la membrane chorio-allantoïque (0,1 ml, embryons de 8 jours).

L'étude du liquide vitellin (Gram et culture) et l'étude histologique de la membrane chorio-allantoïque et de l'embryon ont été réalisées. Dans ces conditions, les granules sont pathogènes pour l'embryon de poulet. Environ 50 p. 100 des embryons meurent en deux à quatre jours avec des lésions histologiques intenses et caractéristiques. D'autres meurent dans les quelques jours qui suivent et enfin quelques-uns survivent.

a) *Inoculation sur la membrane chorio-allantoïque.* — Les embryons mourant précocement sont plus petits que les témoins et très altérés, avec de larges hémorragies. La membrane présente des zones d'œdème et d'opacification avec pétéchies et hémorragies. Les frottis de membrane colorés au May-Grünwald-Giemsa ou au Gram montrent de profondes altérations cellulaires.

b) *Inoculation par voie vitelline.* — L'étude du vitellus montre l'existence de corps globuleux et d'abondants granules. La culture, après une évolution variable, peut donner le streptocoque normal.

Les embryons sacrifiés ou morts tardivement présentent aussi des lésions, moins intenses cependant. En général, nous n'avons pas trouvé de différences significatives entre les embryons inoculés avec des granules d'origines différentes.

Microscopiquement, on retrouve des granules dispersés ou en chapelet dans la lumière des vaisseaux ou dans les endothéliums.

Nous avons laissé éclore l'un des embryons après trois passages d'œuf en œuf : le poussin était d'apparence normale, mais quarante-deux jours après l'éclosion, il présenta une tuméfaction de la partie inférieure du bec. Cette tuméfaction grossit jusqu'à la taille d'une noisette et l'état général du poussin, qui ne pouvait plus manger, s'altéra ; il fut alors sacrifié. La tuméfaction, qui se présentait comme une masse indurée de tissu nécrosé et hémorragique, a pu être interprétée comme un processus inflammatoire d'abord chronique puis devenu subitement évolutif. On nota la présence d'éosinophiles, mais surtout de granules dispersés et en chapelet. On retrouva et identifia dans les cultures de broyats du foie et de la tuméfaction le streptocoque initial. Dans le sang obtenu par ponction cardiaque *post mortem*, quelques globules blancs contenaient des granules Gram +.

Les résultats des examens histologiques concernant le pouvoir pathogène font l'objet d'un mémoire séparé [3].

STABILISATION DES GRANULES.

Au cours des passages de granules par voie vitelline, nous avons constaté qu'à partir du second passage, les subcultures devenaient négatives. Cependant, les granules se multipliaient, puisqu'on pouvait les retrouver en abondance dans le liquide vitellin et que l'on pouvait réinfecter des œufs dans les mêmes conditions par réinoculation. Cinq passages en série ont été réalisés avec des inoculums dilués et ont prouvé cette multiplication. Les granules ainsi « fixés » ont perdu la faculté d'évoluer *in vitro* dans les conditions où nous avons opéré et se comportent donc comme des parasites obligatoires à la manière des virus.

DISCUSSION ET CONCLUSION.

Les connaissances relatives aux formes L et aux formes granulaires des bactéries sont loin d'être complètes, mais une chose au moins est certaine : leur morphologie, leurs exigences de culture, leur faculté de filtration, leur mode de reproduction, leur résistance aux agents nocifs et leur pouvoir pathogène expérimental en font des éléments caractéristiques et différents des germes de la bactériologie classique. Pourtant, que le germe soit un coque ou un bacille, qu'il soit Gram+ ou Gram—, la phase granulaire et les corps globuleux ont toujours le même aspect, tout au moins dans l'état actuel de nos connaissances. C'est ce que nous avons appelé le « phénomène de convergence ».

Il semble bien que la transformation spontanée de bactéries en formes granulaires ait lieu même dans les cultures normales, mais à une fréquence extrêmement faible. Dans une population bacté-

rienne, certains individus moins résistants réagissent aux conditions défavorables pour eux en passant en forme L ou en phase granulaire. Ceci explique le résultat de la filtration des cultures normales. Mais si la culture tout entière est placée dans de mauvaises conditions physiques, chimiques, ou biologiques, l'ensemble des bactéries peut se transformer. Si l'on compare ces éléments au germe normal, on constate que leur culture est très lente et que les diverses préparations sont douées d'un potentiel évolutif très variable selon l'origine et les conditions auxquelles elles sont soumises. Par contre, ils sont insensibles aux antibiotiques et leur évolution s'accommode d'une zone de température bien plus large que celle du germe normal. Ils ont une taille qui leur permet de traverser les bougies L₃ et ils sont capables, soit de se fixer à l'état de granule, soit, le plus souvent, de redonner le germe dont ils sont issus.

Quelle que soit leur origine, les formes granulaires subissent une évolution morphologique complexe mais comportant des phases caractéristiques. La description et surtout la comparaison entre les observations de divers auteurs sont rendues difficiles car il existe sûrement plusieurs voies pour aller de la bactérie à la forme granulaire. Il y a diverses voies d'évolution distinctes avec de multiples stades intermédiaires complexes, obligatoires ou non, d'où la possibilité de décrire plusieurs « cycles » différents suivant les conditions d'expérimentation. Il y a cependant peu de raisons de croire que les granules obtenus finalement soient fondamentalement différents. Dans nos expériences, l'évolution des granules produits naturellement *in vivo*, s'est révélée tout à fait parallèle à celle des granules produits artificiellement par l'action de divers agents.

Les propriétés des formes granulaires permettent d'essayer de comprendre la signification biologique de ces éléments. Le fait que les granules évoluent plutôt qu'ils ne se multiplient, et aussi leur résistance aux écarts de température, aux antibiotiques, au vieillissement [9], nous portent à penser qu'ils représentent des sortes de formes de résistance. Par contre, les corps globuleux, avec leur très forte capacité de multiplication par bourgeonnement et leur fragilité, représenteraient les éléments de reproduction et de continuité génétique. Dans de nouvelles conditions de milieu aurait lieu la phase de retour et le début d'une nouvelle phase de multiplication selon la voie normale.

Les formes granulaires de streptocoque utilisées au cours du présent travail ont montré un net pouvoir pathogène. Elles provoquent des lésions du système vasculaire de l'embryon de poulet avec atteintes cellulaires. Elles ont également une affinité certaine pour les hématies : on voit fréquemment les granules adsorbés sur les globules rouges, fait qui rappelle les observations de

Mulé au microscope électronique. Cet auteur a en effet décrit, dans le sang de malades atteints de scarlatine [6, 7] ou de fièvre rhumatismale [8], des éléments corpusculaires fixés aux hématies. Enfin, nous avons observé une affection chronique chez un poussin né d'un œuf inoculé, avec un réveil et une poussée évolutive due vraisemblablement à un retour à la forme bactérienne originale, terme d'une lente évolution.

Le rapprochement de ces faits nous amène à discuter du rôle possible des granules en pathologie humaine. Les facteurs actifs *in vitro* pour favoriser le déclenchement massif chez les bactéries d'une transformation, dont le stade extrême est la forme granulaire, sont sans aucun doute actifs également *in vivo* [10]. Chez l'homme, les germes, soumis aux actions d'antibiotiques ou d'anticorps, peuvent donc se transformer et il faut envisager la possibilité du pouvoir pathogène de ces nouveaux éléments d'origine bactérienne. Cependant, étant donné la diversité et la complexité des facteurs biologiques qui interviennent chez l'homme, il n'existe pas nécessairement un parallélisme strict entre le réseau des évolutions que nous connaissons *in vitro* et les évolutions suivies dans l'organisme du malade.

Nous avons entrepris l'application à la clinique qu'impliquent ces notions en tentant l'isolement de formes granulaires à partir de cas d'endocardite à hémoculture négative [13]. Nous avons ainsi isolé, par hémoo-culture, des granules dans un cas d'endocardite maligne à hémoculture négative et obtenu le retour de ces éléments à une forme bactérienne identique à un germe isolé auparavant chez le malade. Nous avons aussi décelé par la même méthode l'existence de granules, dans un cas de maladie d'Osler à hémoculture négative. Il apparaît donc que ce que les cliniciens appellent « phase abactérienne », au cours de certaines maladies, n'est réel que dans une certaine mesure : il existe vraisemblablement une « phase granulaire », stade plus ou moins long du cycle de la bactérie initiale. Il faut envisager, de plus, la possibilité du rôle que les granules pourraient jouer dans l'étiologie d'un certain nombre de maladies dites « d'origine inconnue ».

Un point d'ailleurs doit être précisé, c'est le rapport existant entre les formes L, les divers cycles d'évolution bactérienne et les formes granulaires. On sait qu'au cours du cycle L, apparaissent des éléments nommés « formes naines » ou « unités minima reproductrices » [1]. Par ailleurs, on connaît des formes filtrables de bactéries obtenues soit par l'un des moyens décrits dans ce travail, soit par lyse bactériophagique [4] ou autres procédés. Il est difficile de savoir si tous ces éléments sont équivalents car les procédés appliqués à leur étude varient suivant les auteurs [5]. Mais il semble que les propriétés de tous ces éléments aient de nombreux points communs. On peut donc concevoir que

les cycles d'évolution bactérienne, décrits par divers auteurs, possèdéraient un stade commun, caractérisé par un élément granulaire capable d'évolution et de retour vers la bactérie initiale, suivant des modalités très différentes selon les conditions expérimentales.

Tout ce que nous venons de dire touche certainement le problème fondamental des rapports entre les bactéries et les virus. Nous avons vu que seulement une petite proportion de granules sont capables d'évoluer jusqu'à la bactérie normale, mais aussi de se multiplier *in vivo* (embryon de poulet et culture de tissus). D'autres faits encore, tels que par exemple l'existence, pendant l'évolution des granules, d'éléments ressemblant aux « beignets » décrits au cours de la reproduction du bactériophage, rappellent l'hypothèse émise par Charles Nicolle au sujet de la continuité entre bactéries et virus. Les « granules fixés » que nous avons obtenus par passages d'œuf en œuf, qui sont, dans une certaine proportion, pathogènes pour l'embryon de poulet et sont incapables de se multiplier *in vitro*, mais ont la propriété de se fixer sur les hématies *in vivo* et de provoquer des lésions cellulaires qui ressemblent en une certaine mesure aux lésions produites par les virus, ne sont-ils pas intermédiaires entre les bactéries et les virus ?

RÉSUMÉ.

Des formes granulaires ont été obtenues par différents procédés *in vivo* ou *in vitro* à partir d'une souche de *S. viridans* (var. *Sbe* ou *sanguis*). Le déclenchement de cette transformation, la morphologie et l'évolution des granules, l'influence des milieux de culture et des facteurs externes, la constitution des granules et leur pouvoir pathogène sont décrits en détail. Les formes granulaires possèdent un potentiel évolutif très variable selon leur origine et leur état. Les deux termes extrêmes de leur évolution semblent être le retour à la bactérie d'origine d'un côté, et la stabilisation sous forme de parasites obligatoires de l'autre. Les formes granulaires jouent vraisemblablement un rôle en pathologie humaine et possèdent dans certains cas des propriétés intermédiaires entre celles des bactéries et celles des virus.

SUMMARY.

STUDIES ON L FORMS SPONTANEOUSLY APPEARING *in vivo*.

II. PECULIAR PROPERTIES OF THE GRANULES.

By means of different processes, granular forms have been obtained *in vivo* and *in vitro* from a strain of *S. viridans* (var. *Sbe* or *sanguis*). The onset of this transformation, the morphology

and evolution of the granules, the influence of culture media and environmental factors, the constitution of the granules and their pathogenicity are described. Granular forms possess a potentiality of evolution varying with their origin and the stage of their evolution. The two extreme limits of their evolution seem to be the reversion to the original bacterium on one side, and the stabilisation under the form of obligatory parasites on the other side.

Granular forms probably play a part in human pathology and possess in certain cases intermediate properties between those of bacteria and those of viruses.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] CARRÈRE (L.). Communication personnelle.
- [2] HANNOUN (C.) et VIGOUROUX (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 670.
- [3] HANNOUN (C.), VIGOUROUX (J.), LEVADITI (J.) et NAZIMOFF (O.). *Ann. Inst. Pasteur* (sous presse).
- [4] HAUDUROY (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1924, **401**, 1209.
- [5] MINCK (R.). *Rev. Immunol.*, 1955, **49**, 86.
- [6] MULÈ (F.). *Atti VI Cong. Int. Microb.*, Rome, 1953, **6**, 71-76.
- [7] MULÈ (F.). *Experientia*, 1954, **10**, 205.
- [8] MULÈ (F.). *Atti VI Cong. Int. Microb.*, Rome, 1953, **6**, 64-70.
- [9] PRÉVOT (A.-R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1941, **67**, 471.
- [10] ROUX (J.). Communication personnelle.
- [11] VIGOUROUX (J.) et HANNOUN (C.). *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **242**, 2603.
- [12] VIGOUROUX (J.) et HANNOUN (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 912.
- [13] VIGOUROUX (J.) et HANNOUN (C.). *Communc. I^{er} Congrès Intern. Path. Infect.*, Lyon, mai 1956.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.*)

Séance du 8 Novembre 1956

Présidence de M. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE.

COMMUNICATIONS

DISSOCIATION PAR L'EAU OXYGÉNÉE DES SOUCHES ISONIAZIDO-RÉSISTANTES DE BACILLES TUBERCULEUX

par B. KREIS et E. LE JOUBIOUX (*) (**).

(*Clinique de la Tuberculose de la Faculté de Médecine de Paris*
[professeur : Etienne BERNARD])

La notion que les bacilles tuberculeux isoniazido-résistants dépourvus de catalase, ou d'activité catalasique faible, ont un pouvoir pathogène distinct de celui des bacilles d'activité catalasique normale incite à rechercher une technique permettant d'identifier ces deux types de bacilles dans les souches où ils sont mêlés. Certes, on peut dissocier les souches en colonies séparées dont on titre ensuite l'activité catalasique, mais c'est une technique lente et laborieuse.

Or, on sait que les cellules dépourvues de catalase sont très sensibles à l'action toxique de H_2O_2 , l'une des propriétés de l'enzyme étant justement de protéger la cellule contre H_2O_2 formé au cours des oxydations biologiques. En ce qui concerne le bacille tuberculeux, sa culture a pu être obtenue malgré l'adjonction de H_2O_2 dans le milieu de culture, à une concentration allant jusqu'à 4 p. 100 (Andrejew [1]). En revanche, Bönicke [2], comme Knox et ses collaborateurs [3], ont vérifié l'action bactéricide de H_2O_2 sur les bacilles tuberculeux isoniazido-résistants dépourvus de catalase. Cette sensibilité différente à H_2O_2 des bacilles, suivant leur activité catalasique, pourrait permettre

(*) Aide technique : M^{lle} S. Fournaud.

(**) Travail réalisé à l'aide de la Caisse Nationale de Sécurité Sociale et de l'Institut National d'Hygiène (professeur Bugnard).

de dissocier les populations bactériennes, en ne laissant survivre que les germes les plus riches en catalase. Nous avons procédé à cette expérience.

L'épreuve est fonction de la concentration de H_2O_2 adoptée puisque, avec une concentration suffisante, tous les germes sont tués. Nous avons adopté une concentration de 0,03 p. 100, voisine de celle qui peut exister dans les conditions biologiques. (C'est en particulier la concentration limite que Tschesche et coll. [4] trouvent dans l'expectoration.) A 0,8 ml de culture en milieu de Dubos, âgée de 8 jours, de la souche à étudier, titrant 1 mg par millilitre, nous ajoutons 0,2 ml de H_2O_2 à 0,15 p. 100. Parallèlement, à 0,8 ml de la même culture, on ajoute, dans un autre tube, 0,2 ml d'eau distillée. Les deux tubes sont mis à l'étuve à 37° pendant trois heures. On pratique alors des dilutions successives, jusqu'à 10^{-6} , du contenu de chacun des tubes et on ensemence sur Löwenstein-Jensen.

Le titre de la solution de H_2O_2 doit être déterminé par manganimétrie avant chaque expérience; le pH du milieu de culture additionné de H_2O_2 ne doit pas être inférieur à 6,8.

TABLEAU I. — Activité catalasique et numération des bacilles sur Löwenstein-Jensen avant et après exposition des souches, pendant trois heures à 37°, à une concentration de 250 mcg/ml de H_2O_2 en milieu de Dubos titrant 0,8 mg de bacilles par millilitre.

A. avant Exposition à H^2O^2			A. après Exposition à H^2O^2			% H^2C^2 décomposé par les colonies survivantes
Souches	% H^2O^2 décomposé	Nombre de Colonies pour 10^6 /mg/bac	Nombre de Colonies pour : (bac)			
			10^{-6} mg	$2/10^{-5}$ mg	$2/10^{-5}$ mg	
Sa...	0%	79	0	0	0	
Ca...		35	0	0	0	
Ni...		30	0	0	0	
Vc...		140	0	0	0	
Le...	20%	100	0	0	0	
Mo...	30%	235	1	1	260	100%
Ja...		282	69	+++	+++	40%
Chal...		149	0	0	0	
Lo...	40%	+++	27	+++	+++	80%
Bu...		72	0	7	+++	
Co...		64	66	+++	+++	40%
Gol...		43	0	0	0	
Ha...		64	0	0	0	
Bo...		98	0	0	0	
De...		63	0	0	5	40%
Gr...		76	8	14	+++	80%
Bom...		121	0	0	31	
Dec...		23	0	0	30	
Lec...	50%	114	5	28	+++	60%
Ob...		72	0	0	1	50%
Sq...		29	0	0	0	
Du...		128	0	0	15	48%
Qu...		110	0	0	16	50%
Chal...	60%	21	28	48	+++	90%
Lac...		181	25	66	+++	60%
Tch...		114	0	2	+++	60%
Sri...		19	12	18	+++	90%
He...	80%	47	24	195	+++	100%
5373	100%	270	197	+++	+++	100%
5385		278	154	+++	+++	100%
5156		61	76	209	+++	100%

Le tableau I montre que, conformément à nos prévisions, les bacilles des souches dépourvues de catalase ont tous été tués par la concentration de H_2O_2 utilisée. A l'opposé, le nombre de germes vivants des souches d'activité catalasique forte n'a été que très modérément ou nullement affecté par le contact avec l'eau oxygénée.

Mais il est particulièrement intéressant d'étudier le comportement des souches d'activité catalasique faible, variant entre 30 et 60 p. 100 (1). On sait que certaines de ces souches conservent un pouvoir pathogène normal, tandis que d'autres ont le pouvoir pathogène particulier des souches dépourvues de catalase [6]. La dissociation par H_2O_2 semble en donner la raison : certaines sont entièrement tuées par H_2O_2 et se rapprochent ainsi des souches dépourvues de catalase, d'autres sont seulement partiellement affectée par H_2O_2 et gardent assez d'éléments vivants riches en catalase pour manifester un pouvoir pathogène normal.

Ainsi l'exposition à l'action bactéricide de H_2O_2 semble constituer une technique d'analyse des souches plus fine que la mesure de l'activité catalasique. Cette dernière, même déterminée à l'appareil de Warburg, n'est qu'une estimation globale et ne rend pas compte de l'existence de bacilles d'activité catalasique diverse dans la population microbienne : elle est incapable de renseigner régulièrement sur la

TABLEAU II. — Accroissement de l'action bactéricide de H_2O_2 quand on diminue la quantité de germes.

	Quantité de germes soumis à H^2O^2							
	0,8 mg / ml		10^{-2} mg / ml		10^{-4} mg / ml		10^{-5} mg / ml	
	T. mort.	H^2O^2	T. mort.	H^2O^2	T. mort.	H^2O^2	T. mort.	H^2O^2
Nombre de colonies pour	283	247					28	5
10^{-6} mg	++++	++++			270	12		
10^{-5} mg	++++	++++	++++	250				
10^{-3} mg								

présence de moins de 5 p. 100 de bacilles riches en catalase dans une souche apparemment dépourvue de cet enzyme. Au contraire, l'exposition à H_2O_2 isole directement ces bacilles riches en catalase. Bien plus, elle fait un tri parmi les souches d'activité catalasique faible, la plupart succombant totalement à l'épreuve, mais d'autres lui survivant en grande partie.

(1) La mesure de l'activité catalasique a été pratiquée avec la méthode que nous avons décrite précédemment (Cf. [5]).

Cependant, le phénomène de bactéricidie par H_2O_2 est complexe. Il fait intervenir non seulement la concentration de peroxyde et la durée d'exposition, mais aussi le nombre de bacilles porteurs de catalase mis en jeu.

En effet, dans une souche d'activité catalasique moyenne, tous les éléments ne sont pas également riches en catalase, ni également sensibles à l'eau oxygénée. Si l'on fait intervenir une grosse masse de bacilles, il en résulte une décomposition rapide de l'eau oxygénée qui abaisse notablement sa concentration et permet à des bacilles relativement peu riches en catalase de survivre. Pour notre souche H37RvS, le pourcentage d'eau oxygénée décomposée a été de 60 p. 100 après une heure, 80 p. 100 après deux heures et 90 p. 100 à la troisième heure.

Ces bacilles sont au contraire tués quand on les expose à la même concentration initiale de H_2O_2 mais en très petit nombre. C'est ce que montre l'expérience suivante :

A partir d'une culture en Dubos de la souche H37RvS, âgée de 8 jours et titrant 1 mg/ml de bacilles, on prépare des dilutions en eau physiologique titrant 10^{-2} , 10^{-4} et $0,5 \times 10^{-5}$ mg/ml de bacilles.

On répartit respectivement dans deux tubes 0,8 ml de la culture initiale et de chacune des dilutions. L'un des tubes reçoit alors 0,2 ml de H_2O_2 à 0,15 p. 100 et l'autre 0,2 ml d'eau distillée. On met à l'étuve à 37° pendant trois heures, puis on ajoute, dans tous les tubes, 1 goutte de sang humain frais qui arrête l'action de l'eau oxygénée. Onensemence sur milieu de Löwenstein 10^{-1} ml de chacune des dilutions ; pour les tubes contenant 0,8 mg/ml de bacilles, des dilutions successives allant jusqu'à 10^{-6} mg/ml sont ensemencées parallèlement. La numération des colonies sur les tubes est faite au bout d'un mois à six semaines.

Les résultats obtenus montrent que le nombre des colonies est pratiquement le même pour les dilutions réalisées à partir du tube témoin contenant 0,8 mg/ml de bacilles et le tube correspondant additionné de H_2O_2 . Au contraire, les différences sont considérables entre les nombres de colonies provenant des dilutions témoins et des dilutions exposées à H_2O_2 , ces dernières étant nettement plus pauvres. Il n'est donc pas indifférent d'exposer à une même concentration de H_2O_2 une quantité importante (0,8 mg/ml) de bacilles ou des quantités beaucoup plus faibles. L'activité toxique de H_2O_2 est plus marquée quand la quantité de bacilles est faible.

On peut conclure de cette expérience que les conditions d'épreuve que nous avons adoptées sont trop sévères, puisqu'elles tuent un grand nombre des bacilles pourvus de catalase lorsqu'ils sont exposés isolément à H_2O_2 . Or, il est vraisemblable que ces bacilles pourraient subir le même sort s'ils se trouvaient au sein d'une masse de bacilles dépourvus d'activité catalasique. La méthode ne détecte donc pas sûrement de rares bacilles porteurs de catalase au sein d'une souche sans activité catalasique.

Inversement, dans une masse de bacilles riches en catalase, qui abaisse rapidement la concentration locale en H_2O_2 , certains bacilles d'activité catalasique faible pourraient avoir quelques chances de survivre.

On est ainsi conduit à modifier l'épreuve en réduisant à quelques centaines les germes exposés à H_2O_2 , et en abaissant la durée d'exposition ou la concentration de peroxyde de telle façon que les germes

d'activité catalasique normale puissent tous survivre. Mais cette façon de faire présente deux inconvénients. D'une part, en réduisant le nombre de germes étudiés, on méconnaîtra des bacilles riches en catalase s'ils se trouvent en très petit nombre (10^{-3} à 10^{-4}) dans la population bactérienne. D'autre part, on sera amené à choisir des conditions d'expérience qui varieront selon qu'on voudra laisser survivre des bacilles d'activité catalasique plus ou moins faible, et rien ne prouve *a priori* qu'on aura, ce faisant, laissé survivre tous les bacilles de pouvoir pathogène normal et eux seuls.

Notons aussi que la richesse en catalase n'est probablement pas le seul facteur qui intervienne dans la survie des germes exposés à l'eau oxygénée. C'est ainsi que le bacille de Koch, germe relativement très pauvre en catalase, est beaucoup moins sensible à l'action toxique de H_2O_2 que la plupart des germes banaux, pourtant beaucoup plus riches en catalase. En ce qui concerne les bacilles de Koch, pour une même activité catalasique, ils paraissent inégalement sensibles à l'action toxique de H_2O_2 . C'est ainsi qu'on relèvera sur le tableau I que la souche Go... d'activité catalasique 40 p. 100 est restée absolument indifférente à l'exposition à H_2O_2 , alors que les autres souches de même activité ont perdu une très grande partie ou la totalité de leur population dont n'ont survécu que des germes plus riches en catalase.

La sensibilité à H_2O_2 est-elle plus étroitement liée aux caractères du pouvoir pathogène que la richesse en catalase? Le fait est possible, mais il appartient à l'expérimentation de le prouver.

Cette discussion définit les limites de la méthode que nous proposons. Elle permet de « faire sortir » rapidement d'une population bacillaire mêlée, à réaction catalasique faible ou nulle, un certain nombre des éléments les plus riches en catalase qui s'y trouvent dissimulés. Selon les modalités de l'expérience on obtiendra un nombre variable de colonies plus ou moins riches en catalase, qu'il sera facile de titrer secondairement. Si l'on adopte les conditions que nous avons fixées dans l'expérience du tableau I, les colonies récupérées auront en principe un pouvoir pathogène normal. Mais l'on ne peut affirmer que la méthode met en évidence dans tous les cas les bacilles de ce type qui peuvent subsister dans la population bacillaire mise en expérience.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ANDREJEW (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1946, **72**, 833.
- [2] BÖNICKE (R.). *Naturwiss.*, 1954, **41**, 577.
- [2 bis] BÖNICKE (R.). *Z. Hyg.*, 1956, **142**, 339.
- [4] TSCHESCHE (R.), KORTE (F.) et BETHGE (J.). *Z. Naturforsch.*, 1951, **66**, 22.
- [5] KREIS (B.), LE JOUBIUX (E.) et PARIENTE (D.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 932.
- [6] KREIS (B.) et LE JOUBIUX (E.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956.

**ACCROISSEMENT DE LA RÉSISTANCE
ET CHUTE DE L'ACTIVITÉ CATALASIQUE
DES SOUCHES DE BACILLES TUBERCULEUX
IZONIAZIDO-RÉSISTANTES
MAINTENUES EN CONTACT PROLONGÉ
AVEC L'ISONIAZIDE**

par E. LE JOUBIOUX et B. KREIS (*) (**).

*(Clinique de la Tuberculose de la Faculté de Médecine de Paris
[professeur ETIENNE BERNARD])*

Au cours d'expériences sur la virulence des souches isoniazido-résistantes de bacilles tuberculeux, nous avons été amenés à conserver un certain nombre de ces souches en milieu de Dubos additionné d'isoniazide. Le taux d'isoniazide adopté permettait une culture identique à celle des tubes sans isoniazide.

Pour conserver la vitalité des souches, des passages étaient faits à intervalles éloignés sur de nouveaux milieux de Dubos, contenant toujours le même taux d'isoniazide. Nous soulignons qu'il ne s'est pas agi d'un entraînement progressif de la souche, mais de passages dans des milieux à concentrations constantes d'INH.

En titrant à nouveau un certain nombre de souches ainsi conservées, nous avons constaté que l'activité catalasique de ces souches s'était abaissée et que leur résistance s'était accrue. Le phénomène se manifestait rapidement et complètement pour les hautes concentrations d'isoniazide, lentement et incomplètement pour les concentrations plus faibles.

1° ACTION DES CONCENTRATIONS ÉLEVÉES D'ISONIAZIDE (5 et 20 mcg/ml). — Parmi nos souches résistant complètement soit à 5, soit à 20 mcg/ml d'isoniazide en milieu de Dubos et maintenues en présence de ces concentrations, 16 présentaient initialement une activité catalasique notable. Dans tous les cas, nous avons constaté la perte totale de l'activité catalasique (1). Cette perte a été obtenue en moins de trois mois dans 12 cas sur 16. Toutes les souches initialement résistantes à 5 mcg/ml sont devenues résistantes à plus de 20 mcg. Pour les

(*) Aide technique : M^{lle} S. Fournaud.

(**) Travail réalisé avec l'aide de la Caisse Nationale de Sécurité Sociale et de l'Institut National d'Hygiène (professeur Bugnard)

(1) La détermination de l'activité catalasique a été faite selon notre technique manganimétrique à partir d'une subculture sur milieu de Löwenstein sans isoniazide, pour éviter l'action inhibitrice de ce corps sur la catalase.

souches résistantes à 20 mcg, l'élévation de la résistance n'a pu être étudiée, le taux limite n'ayant pas été déterminé au départ.

Les populations bacillaires des souches ainsi modifiées nous sont apparues homogènes et stables dans sept des neuf cas que nous avons étudiés : dans les deux autres cas, il persistait de rares bacilles à taux catalasique notable.

C'est ainsi que parmi les souches initialement résistantes à 5 mcg et devenues résistantes à 20 mcg, nous avons pratiqué dans deux cas la numération des colonies sur milieu de Löwenstein additionné d'isoniazide : nous avons obtenu le même nombre de colonies avec les concentrations de 5 et de 20 mcg. Dans trois autres cas, nous avons inoculé chacune de nos souches à des cobayes sacrifiés, l'un au quatre-vingt-dixième jour, l'autre au deux centième jour (2). Les bacilles récupérés chez l'un de ces animaux conservaient le même taux de résistance et l'absence d'activité catalasique qui caractérisaient les souches lors de l'inoculation. Pour les deux autres, les bacilles récupérés avaient conservé leur résistance, mais leur activité catalasique s'était élevée et variait de 30 à 90 p. 100.

Pour les souches initialement résistantes à 20 mcg, l'homogénéité a été affirmée, une fois par l'étude de la numération des germes sur milieu de Löwenstein additionné d'isoniazide, trois fois par l'inoculation aux cobayes.

Tableau I					
Souches	Durée de Contact	Nombre de repiquages	Avant	Après	
			Catalase %	Catalase %	Résistance INH
Fres 2690	27 Jours	4	80	0	R > 20
Fres 2423	39 "	4	90	10	R > 20
Bes 4051	65 "	5	30	0	R > 20
Ria A1	66 "	5	40	10	R > 20
Dup	77 "	8	70	0	R > 20
Est	105 "	8	50	10	R > 20
Cle	132 "	8	30	0	R > 20
Chap	140 "	7	70	0	R > 20
Souches résistantes 5 (R < 20 et maintenues en Dubos 5mcg/ml d'INH)					
Sant	25 Jours	4	90	0	R > 20
Che	25 "	4	90	0	R > 20
Bo 3367	43 "	6	60	0	R > 20
Jul	45 "	5	60	0	R > 20
Bo 7756	64 "	5	40	10	R > 20
All	65 "	5	60	0	R > 20
Pav	87 "	5	50	0	R > 20
Lor	138 "	10	60	10	R > 20
Souches résistantes R > 20 et maintenues en Dubos 20mcg/ml d'INH					

(2) On sait que lorsqu'il s'agit de mélanges de germes, les germes sensibles ou catalase positifs se développent avec prédilection chez le cobaye et finissent à la longue par être les seuls survivants.

On doit conclure de ces constatations que les éléments catalase positifs, ou moins résistants, ont le plus souvent disparu des populations bacillaires qui les contenaient, ou tout au moins que leur nombre est devenu inférieur à la limite de sensibilité de nos techniques.

2° ACTION DES CONCENTRATIONS FAIBLES D'ISONIAZIDE (0,1 et 1 mcg/ml). — Pour les souches initialement résistantes à 0,1 et 1 mcg, les résultats ont été moins uniformes.

D'une part, pour que les modifications de la population bacillaire deviennent apparentes, un plus long contact avec l'isoniazide s'est avéré nécessaire. C'est ainsi que sur 10 souches cultivées pendant moins de trois mois dans ces conditions, 6 n'ont manifesté aucun changement de leur activité catalasique ni de leur résistance. Mais les changements se sont montrés constants pour 11 souches maintenues plus de cent jours en présence d'isoniazide.

En second lieu, la perte de l'activité catalasique a été en général moins complète et la résistance s'est moins fortement élevée que dans le groupe précédent.

Tableau II					
Souches	Durée de Contact	Nombre de repiquages	Avant	Après	
			Catalase %	Catalase %	Résistance INH
Post	64 jours	9	80	40	5 < R < 20
Hue	69 "	5	90	60	5 < R < 20
Tru	76 "	6	70	60	5 < R < 20
Jen	178 "	10	80	50	5 < R < 20
All	200 "	9	70	40	R > 20
Le Bli 3532	217 "	11	100	0	R > 20
Le Bli 3477	278 "	15	90	20	5 < R < 20
Gue	282 "	15	90	50	5 < R < 20
Souches résistantes 0,1 < R < 1 et maintenues en Dubos 0,1 mcg/ml d'INH					
Tre	30 jours	5	90	90	1 < R < 5
StV	49 "	5	50	30	1 < R < 5
Lhu	54 "	5	90	90	1 < R < 5
Est	69 "	6	50	50	1 < R < 5
Sch	78 "	5	90	90	1 < R < 5
Fre	78 "	5	80	80	1 < R < 5
Jeff	68 "	5	30	10	R > 20
Mich	112 "	7	90	20	R > 20
Lub	114 "	8	80	10	R > 20
Ath	140 "	11	90	0	R > 20
App	208 "	12	70	50	R > 20
Ker	240 "	12	90	0	R > 20
Mor	270 "	13	100	0	R > 20
Souches résistantes 1 < R < 5 et maintenues en Dubos 1 mcg/ml d'INH					

Des différences importantes s'observent cependant selon la résistance initiale des souches. Parmi les 7 souches résistantes à 1 mcg/ml qui ont été modifiées, l'activité catalasique est devenue pratiquement nulle (0 à 10 p. 100) cinq fois sur 7. Dans tous les cas, la résistance

en milieu de Youmans s'est élevée au-dessus de 20 mcg. L'homogénéité des populations bacillaires a été étudiée dans 5 cas : elle a été confirmée dans 4 cas (deux fois par la numération des germes sur Löwenstein, deux fois par l'inoculation aux cobayes et le titrage des germes récupérés). Dans le cinquième cas (App...), la numération des germes et l'inoculation ont révélé la persistance de germes résistants à moins de 20 mcg et d'activité catalasique partiellement conservée au sein de la souche, malgré deux cent huit jours de culture en présence de 1 mcg d'isoniazide.

Parmi les huit souches résistantes à 0,1 mcg/ml, au contraire, l'activité catalasique, bien qu'un peu affaiblie, n'a disparu que dans un seul cas ; la résistance s'est constamment élevée mais n'a atteint 20 mcg que deux fois sur huit. Enfin, l'homogénéité des populations bacillaires a été étudiée dans 6 cas : cinq fois la souche comportait un mélange de germes différents par leur activité catalasique et leur résistance (reconnus quatre fois par numération et une fois par l'inoculation). La sixième souche (Tru...), après soixante-seize jours de culture en présence de 0,1 mcg d'isoniazide, était devenue résistante à 5 mcg, mais avait eu son activité catalasique à peine affaiblie : ces caractères persistaient chez les bacilles récupérés chez les cobayes.

En bref, lorsque des bacilles sont cultivés longtemps en présence de concentrations faibles d'isoniazide, on constate, comme pour les concentrations plus élevées, une tendance à l'élévation de la résistance et à l'abaissement de l'activité catalasique. Mais il persiste des germes peu résistants et catalase positifs dans la population bactérienne d'autant plus facilement que la concentration en isoniazide est plus basse.

DISCUSSION. — Les constatations précédentes tendent à démontrer que, dans des populations bacillaires comportant des germes de résistance et d'activité catalasique diverses, les bacilles dépourvus de catalase se multiplient plus facilement que les autres en présence d'isoniazide. On peut aussi traduire le même fait en disant inversement qu'un contact prolongé avec l'isoniazide finit par être défavorable à la croissance des bacilles résistants mais porteurs de catalase. Ce pourrait être la conséquence d'une inhibition partielle de la catalase par l'isoniazide, qui gênerait à la longue la croissance des bacilles dont les échanges respiratoires utilisent la catalase ; elle laisserait au contraire indifférents les bacilles dont les synthèses ne font pas intervenir la catalase.

Le nombre de bacilles riches en catalase dans les souches résistantes à plus de 5 mcg/ml est peu élevé : quelques passages suffisent en général à les éliminer ; au contraire, les souches résistantes à 0,1 mcg comprennent souvent une grosse majorité des bacilles d'activité catalasique normale. Leur élimination ne s'obtient pas aisément malgré un séjour prolongé en présence de 0,1 d'isoniazide (jusqu'à deux cent quatre-vingt-deux jours dans un de nos cas).

Il faut signaler que l'espacement des passages que nous avons réalisé (trois semaines à un mois) permettait au bout de quelque temps la destruction de l'isoniazide du milieu et le retour à l'équilibre au bénéfice des souches d'activité catalasique normale. Des passages plus fréquents auraient sans doute abouti à des résultats plus nets.

L'augmentation de la résistance va de pair avec l'abaissement de l'activité catalasique, parce que les bacilles dépourvus de catalase sont fréquemment très résistants et l'on comprend ainsi le passage brusque d'une résistance à 0,1 à une résistance à 20.

L'intérêt des constatations que nous avons faites est d'ordre divers.

En ce qui concerne la *conservation des souches* isoniazido-résistantes, elles montrent les difficultés auxquelles on se heurte si on les maintient en culture en milieu liquide : sur un milieu sans isoniazide les éléments riches en catalase prédominent ; sur un milieu avec isoniazide, c'est l'inverse. De toutes façons, on risque de trouver bientôt une population bacillaire dont l'équilibre est très différent de la population initiale.

Mais plus intéressantes sont les *suggestions thérapeutiques*.

Le pouvoir pathogène modéré des souches résistantes dépourvues de catalase conduit le clinicien à en souhaiter l'apparition là où il ne peut obtenir la disparition des bacilles. Nos constatations indiquent qu'un tel résultat est parfois possible : mais l'on doit alors traiter les malades, même porteurs de bacilles résistants, pendant une durée très prolongée. Il y a avantage, dans ces cas, à réaliser une concentration sanguine d'isoniazide au moins égale, et si possible supérieure à 1 mcg/ml.

COMPARAISON ENTRE LE SÉRUM SANGUIN DU CORDON OMBILICAL ET CELUI DE LA FEMME *POST PARTUM*

par G. SANDOR et M^{me} M. SANDOR.

(Institut Pasteur)

Longworth, Curtis et Pembroke [4], les premiers, ont montré que le taux des α - et β -globulines augmente dans le sérum sanguin de la femme au cours des derniers mois de la grossesse, alors qu'au contraire, les proportions de ces constituants sont abaissées dans le sérum sanguin du cordon ombilical. Ces faits ont été retrouvés depuis par plusieurs auteurs [2, 3, 4, 5, 6, 7, 8]. Vargues [9] étudie la fiche réticulo-endothéliale du sérum sanguin du cordon ombilical et relève une diminution du taux des euglobulines totales et une augmentation de la proportion des γ -euglobulines.

Nous avons tracé la fiche réticulo-endothéliale de cinq sérums sanguins du cordon ombilical individuels et celle d'un mélange de tels sérums. Dans les cinq sérums individuels, le taux des euglobulines totales est fortement diminué, alors que dans le mélange ce taux, au contraire, est légèrement augmenté. Mais dans tous les cas la fiche est fortement déplacée vers la région alcaline par rapport au standard,

attestant une augmentation considérable du rapport : $\frac{\gamma\text{-globulines}}{\text{globulines totales}}$ (fig. 1).

La fiche réticulo-endothéliale a été tracée sur sept sérums obtenus par ponction veineuse chez les femmes immédiatement après l'accouchement. Le type humoral est inusité. Jusqu'à présent, il n'a été rencontré par nous, sauf de très rares exceptions, que dans certains myélomes à β - ou M-globulines (1). A ce type correspond l'augmen-

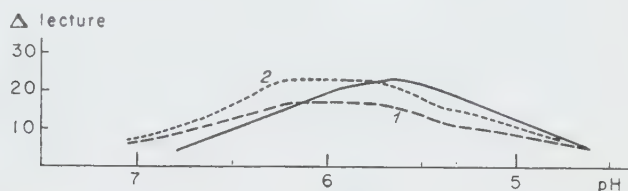


FIG. 1. — Fiche réticulo-endothéliale du sérum sanguin du cordon ombilical.

1 = lecture en grandeur naturelle.

2 = lecture réduite proportionnellement à la hauteur du standard.

Le standard est toujours figuré en traits pleins.

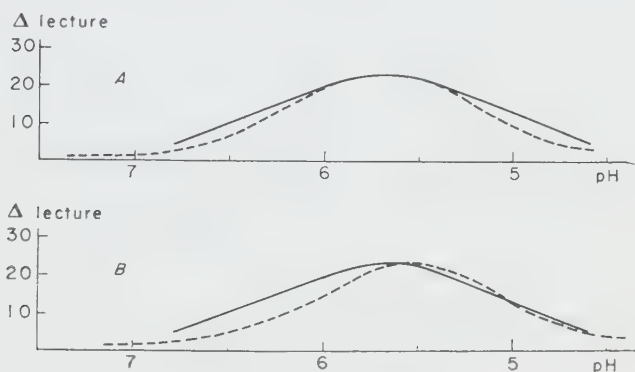


FIG. 2. — Fiches réticulo-endothéliales des sérums sanguins de femmes *post partum*.

A. Un premier type semblant moins fréquent.

B. Le type semblant le plus général.

tation du rapport : $\frac{\beta\text{-globulines}}{\text{globulines totales}}$ [11]. A côté de ce caractère qui se retrouve chez tous nos sujets, cinq fois sur les sept sujets étudiés, le rapport $\frac{\gamma\text{-globulines}}{\text{globulines totales}}$ subit une diminution préférentielle, celui des $\frac{\alpha\text{-globulines}}{\text{globulines totales}}$ étant relativement maintenu. Nous obten-

(1) Ainsi fut appelée par Gutman [10] la globuline myélomateuse qui a une mobilité intermédiaire entre les γ - et les β -globulines.

nous ainsi une fiche caractéristique de la femme *post partum* et aussi, très probablement, des derniers mois de la grossesse (fig. 2).

Il serait tentant d'expliquer ces faits en admettant que, par suite d'un processus sécrétoire actif de l'épithélium syncytial, la mère saigne, en quelque sorte, ses γ -globulines dans le courant circulatoire du fœtus à terme. Ce processus sécrétoire, ici, étant comparable à la sécrétion des « immunoglobulines » par la glande mammaire dans le colostrum chez les ruminants [12, 13, 14, 15, 16], chez lesquels le placenta est imperméable aux protéides sériques. Or, l'immunité passive ainsi acquise, nous le savons, joue un rôle fondamental dans la défense anti-infectieuse pendant les premiers mois après la naissance alors que l'enfant est encore incapable de faire en quantité convenable la synthèse des γ -globulines, supports des anticorps. L'augmentation du taux des β -globulines dans le sérum maternel aussi est intéressant à relever ; elle pourrait avoir, croyons-nous, une raison hormonale.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LONGSWORTH (L. G.), CURTIS (R. M.) et PEMBROKE (R. H.). *J. clin. Invest.*, 1945, **24**, 46.
- [2] EVERBECK (H.) et LEVENS (H. F.). *Monatsh. Kinderheilk.*, 1950, **98**, 430.
- [3] CASPANI (R.), NEGRI (N.) et STICCA (C.). *Minerva Pediatr.*, 1953, **5**, 67.
- [4] RAFSTEDT (S.) et SWAHN (B.). *Acta Paediatric.*, 1954, **43**, 221.
- [5] STUDNITZ (W. V.). *Scand. J. clin. Lab. Invest.*, 1955, **7**, 324.
- [6] DREVON (B.) et DONIKIAN (R.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1955, **37**, 605.
- [7] KUHN (W. J.) et HYLAND (P. Y.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1956, **92**, 1.
- [8] PULS (W.) et ALBAUM (K. H.). *Clin. chim. Acta*, 1956, **1**, 287.
- [9] VARGUES (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 466.
- [10] GUTMAN (A. B.). *Adv. Prot. Chem.*, 1948, **4**, 155.
- [11] SANDOR (G.), LAGRUE (G.) et LE BOT (M^{lle} Y.). *Semaine des Hôp.*, 1954, **30 B**, 319.
- [12] SMITH (T.) et LITTLE (R. B.). *J. exp. Med.*, 1922, **36**, 181.
- [13] ORCUTT (M. L.) et HOWE (P. E.). *J. exp. Med.*, 1922, **36**, 291.
- [14] MASON (J. H.), DALLING (T. A.) et GORDON (W. S.). *J. Path. Bact.*, 1930, **33**, 783.
- [15] SMITH (E. L.). *J. biol. Chem.*, 1946, **164**, 345.
- [16] HANSEN (R. G.) et PHILLIPS (P. H.). *J. biol. Chem.*, 1947, **171**, 223 ; 1949, **179**, 523.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES *PSEUDOMONADACEAE* PRÉCISIONS TAXONOMIQUES SUR LE GENRE *ACINETOBACTER*

par JEAN BRISOU.

(Institut Pasteur, Service des Anaérobies)

Les recherches poursuivies depuis plus de quatre ans sur la famille des *Pseudomonadaceae*, les bilans que ces études obligent à établir, les mises à jour continuelles des classifications et les aménagements

réalisés permettent à l'heure actuelle de mieux préciser la constitution de la tribu des *Achromobacterae*, deuxième de la famille des *Pseudomonadaceae*. L'homogénéité dont nous pensons l'avoir dotée permet d'y grouper aisément des bactéries récemment décrites par différents auteurs.

La tribu des *Achromobacterae* définie en 1948 par J. Magrou et A.-R. Prévot [1] comprend les *Pseudomonadaceae* achromogènes. Très répandus dans la nature, les représentants en sont mobiles ou non. On en distinguait autrefois deux genres : *Achromobacter* et *Mycoplana*.

Avec A.-R. Prévot, nous avons défini le genre *Acinetobacter* [2] pour individualiser les espèces immobiles.

Les bactéries dont il sera question ici appartiennent à ce genre *Acinetobacter*, dont voici les caractéristiques essentielles :

Bâtonnets Gram-négatifs, immobiles, asporulés, souvent capsulés, de taille moyenne ou très courts, prenant parfois l'aspect de *Neisseria*. Ces bactéries croissent aisément sur tous les milieux.

Il comprend quelques espèces pathogènes pour l'homme et les animaux et de très nombreux saprophytes vivant dans les eaux douces, les eaux salées, les vases et sur les objets les plus variés.

Les caractères biochimiques de ces germes permettent de distinguer des espèces gélatinolytiques, glucidolytiques, réductrices de nitrates, et des espèces dépourvues de ces propriétés. Il a donc été facile avec ces données d'établir une clé de détermination que nous résumons ici :

A. GÉLATINE LIQUÉFIÉE.

I. Nitrates réduits en nitrites :

- a) Glucidolytique : *Ac. stationis*.
- b) Non glucidolytique : *Ac. stenohalis*.

II. Nitrates non réduits en nitrites :

- a) Glucidolytiques : *Ac. butyri*, *Ac. saponiphilum*.
- b) Non glucidolytique : *Ac. marshallii*.

B. GÉLATINE NON LIQUÉFIÉE.

I. Nitrates réduits en nitrites :

- a) *Ac. spermophilum*, *Ac. equirulis*, *Ac. delmarveae* et variétés : *gintottensis*, *ubiquitum*, *nitrovorum*, *fermentationis*, *filefaciens*, *Ac. nasalis*, *Ac. parvulum*.

II. Nitrates non réduits en nitrites :

- a) Indologène, H_2S + : *Ac. larvaeae*.
- b) Pas d'indole, H_2S + : *Ac. tangellensis*, *Ac. eurydice*.
- c) Ni indole, ni H_2S : 1° Glucidolytiques : *Ac. anitratum*, *Ac. winogradskyi*, *Ac. coccoideum* et variétés : *oxygenes*, *lacticum*, *acidum*, *middletowni*. 2° Non glucidolytiques : *Ac. lwoffii* var. *brevis* et *bacteroides*, *Ac. viscosum*, *Ac. metalcaligenes* et variétés : *jogense*, *rodonatum*, *refractum*, *candicans*, *connii*, *Ac. cyprinicida*, *Ac. alginicum*.

En construisant ce plan de détermination, nous avons pensé éviter pour l'avenir certaines hésitations, certaines erreurs de diagnose, la création de types nouveaux qualifiés de « protéolytiques », « glucidolytiques », non glucidolytiques, etc., peu conformes avec les règles de la nomenclature internationale.

Des exemples récents confirmeront cette façon de considérer le problème.

Avec nos anciens collaborateurs [3, 4, 5, 6], nous avons étudié *B. anitratum*, qui changeait périodiquement de famille et de genre sans trouver sa position systématique définitive. On le qualifie du reste encore de *Bacterium anitratum*, de *Moraxella*, de *Mima* ; il prend même place dans certains traités parmi les *Enterobacteriaceae*. Ce germe offrant les caractères essentiels des *Achromobactereae*, nous l'avons inclus dans cette tribu tout d'abord comme *Achromobacter* [5, 6], puis dans le genre *Acinetobacter* dès que ce dernier fut défini.

Billing [7] admet cette conception en plaçant dans la tribu des *Achromobactereae* un germe nouveau dont on dira dans un instant les caractères. L'auteur anglais ne semble pas avoir eu connaissance du genre *Acinetobacter*. Le bacille de Billing est considéré par son auteur comme une variété protéolytique de l'*Achromobacter anitratum*. En fait, il vient tout naturellement prendre place dans le groupe des gélatinolytiques, nitrites négatifs, glucidolytiques, ce qui le fait voisiner avec *Ac. butyri*, dont il ne se distingue que par quelques réactions sucrées minimes. Il en résulte que la bactérie décrite par Billing doit s'appeler plus simplement *Acinetobacter saponiphilum* au lieu de *Achromobacter anitratum*, variété *saponiphilum*. Le caractère protéolytique élève le germe au rang d'espèce ; ceci évite en outre toute confusion possible avec l'espèce *anitratum* suffisamment bien individualisée maintenant.

D. Piéchaud et collaborateurs ont récemment décrit des germes qu'ils considèrent comme des variétés protéolytiques de *Moraxella lwoffi* et de *Moraxella glucidolytica*. Or ces microbes prennent aisément place dans notre systématique sans qu'il soit nécessaire d'invoquer des variétés ou des types 1 et 2. Les souches de D. Piéchaud qui n'acidifient aucun milieu sucré sont très voisines sinon identiques à l'ancien *Alcaligenes marshallii* que nous appelons *Acinetobacter marshallii* ; ce microbe est connu depuis 1903. De même que les variétés décrites par les auteurs cités plus haut, *Ac. marshallii* est protéolytique, alcalinise le lait, le peptonise lentement, reste sans action sur les sucres, croît sur pomme de terre en donnant un enduit chamois ou jaune citron pâle, etc. Il n'est donc pas indiqué de les considérer comme appartenant au genre *Moraxella*. Les souches glucidolytiques, sans action sur les nitrates, sont très proches de la bactérie décrite par Billing à peu près en même temps. On ne manque pas d'être frappé par la similitude de la plupart des caractères : acidification des mêmes sucres : glucose, galactose, xylose, arabinose, lactose ; même alcalinisation du milieu au citrate de sodium, etc. Il serait évidemment utile de comparer expérimentalement les deux souches, mais il paraît dès maintenant raisonnable de les grouper dans la même famille et le même genre puisque les caractères morphologiques et culturels majeurs sont identiques.

DISCUSSION. — Ces exemples choisis parmi les plus récents font sentir la nécessité d'un accord définitif sur la position taxonomique de germes qui, depuis la description de *B. anitratum*, divisent les microbiologistes et les amènent à des conceptions opposées. Une étude objective

des caractères de ces microbes très répandus montre qu'ils s'incorporent sans difficulté dans la tribu des *Achromobactereae*, genre *Acinetobacter*.

Dans ce genre, toutes les possibilités ont été envisagées : protéolyse, attaque des sucres, des nitrates, ou absence de ces activités. On évite, en adoptant ce point de vue, la subdivision en types ou variétés dans une même espèce. On a aussi la surprise de reconnaître des germes décrits depuis longtemps et tombés dans l'oubli et repris ensuite pour des espèces nouvelles... On peut espérer que la famille des *Moraxella* se réduira aux seules espèces parasites, hémophiles ou sérophiles. Ce bactéries essentiellement parasites n'ont en effet que des rapports très lointains avec des espèces que l'on rencontre surtout dans la nature : sol, eaux douces, eaux ferrugineuses, eaux de mer, qui peuvent s'adapter aux coquillages, passer dans les urines et même persister dans les eaux savonneuses, bactéries qui croissent si facilement même sur les milieux les plus simples.

CONCLUSION. — Quelques bactéries Gram-négatives, non chromogènes, protéolytiques, immobiles, récemment décrites par différents auteurs en France et en Angleterre, entrent dans le genre *Acinetobacter* défini en 1954 [2]. Certains de ces microbes étaient déjà connus sous des appellations variées. On propose ici pour elles une systématique logique et une nomenclature conforme aux règles internationales.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] MAGROU (J.) et PRÉVOT (A.-R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1948, **75**, 99.
- [2] BRISOU (J.) et PRÉVOT (A.-R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **86**, 722.
- [3] BRISOU (J.) et MORICHAU-BEAUCHANT (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **82**, 640.
- [4] BRISOU (J.), MORICHAU-BEAUCHANT (J.) et GIMENEZ (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 814.
- [5] BARREAU. *Thèse de Médecine*, Bordeaux, 1953.
- [6] BOURLAT. *Thèse de Médecine*, Bordeaux, 1953.
- [7] BILLING. *J. gen. Microb.*, 1955, **13**, 252.
- [8] PIÉCHAUD (D. et M.) et SECOND (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 517.

RECHERCHES SUR LA TRANSFORMATION L (FORMES NAINES) EN MILIEUX SYNTHÉTIQUES D'UNE SOUCHE DE *PROTEUS*

par R. MINCK, A. KIRN et M^{me} GALLERON.

(Institut d'Hygiène et de Bactériologie
de la Faculté de Médecine de Strasbourg)

Pendant près de vingt ans, à la suite des travaux de Klieneberger-Nobel et surtout de Dienes, confirmés par Tulasne et Minck, on a admis que les formes L des bactéries à Gram négatif ne peuvent se multiplier qu'en présence de protéines animales, sérum de cheval en particulier.

L'un de nous, après des essais de fractionnement du sérum de cheval, n'avait pu isoler une substance active. Edward, en 1953, affirma avoir isolé une fraction albuminique du sérum, active en association avec une fraction lipidique du jaune d'œuf. Cependant, Tulasne et ses collaborateurs montrèrent que l'on peut remplacer, pour certains germes, le sérum par des vitamines du groupe B.

Cette exigence particulière aux formes L semblait traduire l'apparition d'une modification importante du métabolisme du microorganisme au cours de la transformation L.

Medill et O'Kane, en 1954, ont montré que l'on peut en réalité obtenir la transformation L du *Proteus* sur un milieu synthétique gélosé contenant du glucose et du lactate de sodium, un mélange de sels minéraux, des acides aminés et une vitamine : l'amide nicotinique. Les auteurs constatèrent que l'adjonction à ce milieu de culture, très favorable, de substances naturelles suffisait pour inhiber notablement la multiplication des formes L. Ils conclurent que les exigences métaboliques des germes étudiés et de leurs formes L sont identiques ; les formes L ne diffèrent de la forme bactérienne normale que par leur sensibilité à des substances inhibitrices qui existent dans les milieux naturels non synthétiques. Le rôle favorisant du sérum sur la croissance des formes L ne s'explique plus par un apport nutritif, mais par une action de neutralisation de substances toxiques.

En 1956, de Gregorio et Bresciani ont repris dans le détail cette étude avec la souche de *Proteus* P 18 isolée à Strasbourg. Ils confirment les résultats de Medill et O'Kane, mais constatent que, alors que le *Proteus* P 18 sous sa forme normale peut, en milieu synthétique, utiliser aussi bien le glucose que le lactate de sodium comme source de carbone, la transformation L ne s'opère qu'en présence de lactate de sodium ; les colonies L une fois constituées peuvent ultérieurement être repiquées avec succès sur milieu sans lactate, ne contenant que du glucose. Les auteurs concluent à un phénomène de déficience métabolique apparaissant au cours de la transformation L.

Cette constatation des auteurs italiens, si elle est vérifiée, montrerait

l'existence d'une modification sensible du métabolisme bactérien au cours de la transformation L. L'intérêt théorique de ce phénomène nous a incités à reprendre l'étude de cette question.

Nous avons utilisé la même souche de *Proteus* P 18 et différents milieux synthétiques dérivant du milieu décrit par Medill et O'Kane, dont nous donnons ci-dessous la formule :

1° Milieu synthétique de base :

Glucose (autoclavé séparément)	1,0 p. 100
Lactate de sodium	2,0 p. 100
K ₂ HPO ₄	0,9 p. 100
KH ₂ PO ₄	0,1 p. 100
Nicotamide	1 mg/ml
Mélange de sels	0,2 p. 100

2° Mélange de sels (pour 1 litre) :

MgSO ₄ , 7 H ₂ O	40 g
NaCl	2 g
FeSO ₄ , 7 H ₂ O	2 g
MnSO ₄ , 4 H ₂ O	8 g

3° Mélange d'acides aminés :

(Concentration finale du milieu en mg/10 ml.)

Glycine	0,2	DL-sérine	0,4
L-leucine	2,5	DL-valine	4,0
L-tyrosine	3,0	DL-iso-leucine	2,5
L-proline	4,0	DL-phénylalanine	2,0
L-histidine	1,0	Acide DL-aspartique	2,0
L-arginine	2,5	DL-lysine	4,0
DL-alanine	1,0	Acide L-glutamique	10,0
		DL-méthionine	2,0

Le milieu a été gélifié à 2 p. 100.

Milieux utilisés (tous les milieux renferment le mélange tampon, la nicotamide et le mélange de sels minéraux).

Milieu A, contenant lactate de sodium, glucose et acides aminés (milieu de Medill original).

Milieu B, contenant lactate de sodium, glucose, mais les acides aminés sont remplacés par SO₄(NH₄)₂ à 0,1 p. 100.

Milieu C, contenant du lactate de sodium et les acides aminés.

Milieu D, contenant du lactate de sodium et SO₄(NH₄)₂.

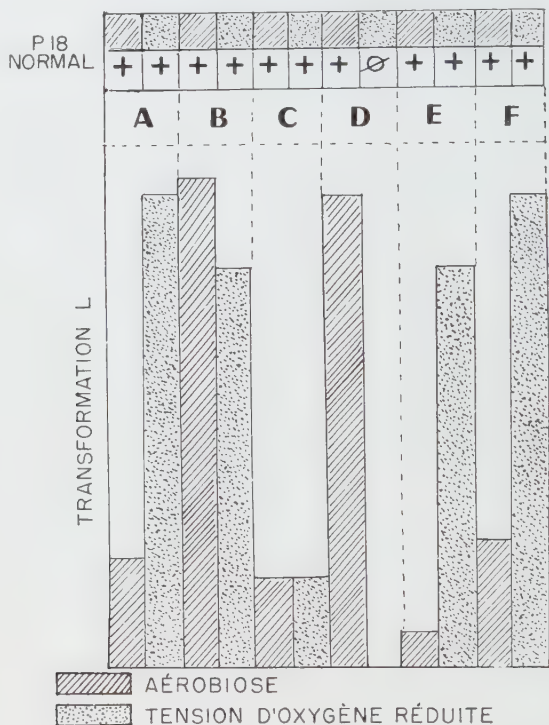
Milieu E, contenant du glucose et les acides aminés.

Milieu F, contenant du glucose et SO₄(NH₄)₂.

Nous avons de plus ajouté 2 000 unités de pénicilline par millilitre de milieu destiné à la croissance des formes L.

Les différents milieux, coulés en boîtes de Petri, furent ensemencés avec une émulsion de *Proteus* cultivé sur gélose inclinée et lavée à plusieurs reprises à l'eau physiologique. Pour l'obtention des formes L, nous avons ensemencé concurremment deux émulsions de concentrations différentes. Les résultats furent comparables.

L'incubation des milieux fut toujours effectuée d'une part en aérobiose (les boîtes de Petri furent scellées à la paraffine au préalable pour éviter la dessiccation du milieu, fatale aux formes L), et d'autre part sous tension d'oxygène réduite selon la technique de Fortner (ensemencement large sur un fragment de gélose déposé dans le couvercle de la boîte de Petri d'une culture de 24 heures de *Serratia marcescens*, puis on scelle hermétiquement la boîte à la paraffine).



A : Acides aminés, lactate, glucose ; B : Sulfate d'ammonium, lactate, glucose ,
C : Acides aminés, lactate ; D : Sulfate d'ammonium, lactate ; E : Acides aminés,
glucose ; F : Sulfate d'ammonium, glucose.

Pour les formes L, la lecture des boîtes fut effectuée du deuxième au sixième jour d'incubation.

RÉSULTATS :

Proteus P 18, forme normale. — La culture fut positive sur tous les milieux, sauf sous tension d'oxygène réduite, sur le milieu D ne contenant que du sulfate d'ammonium et du lactate de sodium (sans glucose) ; des expériences en milieu liquide, dans différentes conditions d'aération, confirmèrent que le lactate de sodium ne peut être utilisé

par le germe qu'en milieu aérobie, lorsque le sulfate d'ammonium constitue la seule source azotée.

Transformation L du Proteus P 18. — Le graphique représente la moyenne des résultats de six séries expérimentales (aucune variation importante ne fut notée dans les différentes séries). A l'inverse des auteurs américains et italiens, la substitution des acides aminés par le sulfate d'ammonium nous donne des résultats sensiblement supérieurs ; nous n'avons observé ni réduction de taille ni retard dans l'apparition des colonies L sur ce dernier milieu. Quel que soit le milieu utilisé, la taille des colonies a toujours été supérieure après incubation sous tension d'oxygène réduite.

Les résultats diffèrent notablement suivant le mode d'incubation. Si nous n'observons pas, comme les auteurs italiens, une absence totale de culture sur milieux sans lactate de sodium, nous constatons néanmoins, en aérobose tout au moins, une action favorable du lactate. Sous tension d'oxygène réduite, nous avons des résultats nettement supérieurs sur milieux contenant du glucose ; l'augmentation de la concentration en glucose (3 p. 100 au lieu de 1 p. 100) améliore encore sensiblement, comme nous l'avons constaté, la croissance L. De même que pour la forme bactérienne normale, le milieu au sulfate d'ammonium et lactate de sodium (sans glucose) a donné des résultats absolument négatifs sous tension d'oxygène réduite.

L'action favorable du glucose peut correspondre, ainsi que les travaux de Mandel et Terranova l'ont montré, à une augmentation relative de la glycolyse anaérobie de la forme L par rapport à la forme bactérienne normale.

Le remplacement du sulfate d'ammonium par les acides aminés permet, en présence de lactate seul, d'obtenir une culture, peu abondante il est vrai, sous tension d'oxygène réduite.

En conclusion, nous avons donc constaté un effet favorable du lactate de sodium sur la transformation L du *Proteus P 18* en milieu aérobie. Le glucose, par contre, améliore nettement la croissance en culture sous tension d'oxygène réduite ; il est même indispensable, aussi bien pour la forme normale que pour la forme L, lorsque le milieu ne renferme pas d'acides aminés. Le lactate de sodium n'apparaît donc pas indispensable à la transformation L de ce germe. Ces expériences, d'autre part, confirment que le métabolisme de ces microorganismes ne subit pas de modifications fondamentales au cours de la transformation L.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] KLIENEGER-NOBEL (E.). *Bact. Rev.*, 1951, **15**, 77.
- [2] DIENES (L.) et WEINBERGER (H. J.). *Bact. Rev.*, 1951, **15**, 245.
- [3] TULASNE (R.). *Biol. Méd.*, 1955, **44**, 1.
- [4] MINCK (R.) et LAVILLAUREIX (J.). *An. Biol.*, 1956, **32**, 153.
- [5] EDWARD (D. G. F. F.). *J. gen. Microb.*, 1953, **8**, 256.
- [6] MINCK (R.). *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, 704.
- [7] TULASNE (R.), TERRANOVA (T.) et LAVILLAUREIX (J.). *Giorn. Microbiol.*, 1955, **4**, 44.
- [8] MEDILL (M. A.) et O'KANE (N. J.). *J. Bact.*, 1954, **68**, 530.
- [9] DE GREGORIO (P.) et BRESCHIANI (F.). *Giorn. Microbiol.*, 1956, **4**, 278.
- [10] MANDEL (P.) et TERRANOVA (T.). *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **242**, 1082.

ESSAIS MÉDICAMENTEUX DANS LE TRAITEMENT PRÉVENTIF DE LA RAGE A VIRUS FIXE CHEZ LA SOURIS

par R. NETTER.

(Institut Pasteur de Saigon)

Nous avons essayé d'éprouver l'action de 33 médicaments sur le virus rabique, et, en particulier, d'établir dans quelle mesure ils pourraient être utilisés comme adjuvants de la vaccination. Nous les avons choisis comme susceptibles d'agir les uns par une action virulicide propre, d'autres en renforçant les défenses de l'organisme, d'autres enfin, s'adressant au système nerveux lui-même, en arrêtant peut-être une réaction en chaîne aujourd'hui encore inéluctable. La raison de tels essais est la disproportion, constatée dans la rage à virus des rues, entre les lésions histologiques ou cellulaires relativement minimes et la gravité extrême de la maladie. Certes, les phénomènes vasculaires sont importants, mais il y a peu de cellules nerveuses manifestement atteintes.

Pour toutes ces recherches, nous avons utilisé le virus fixe *Saigon* à ses 3 090^e à 3 107^e passages.

1^o TECHNIQUES. — Il nous a fallu, la plupart du temps, apprécier pour la souris la DL_{50} toxique du produit à éprouver, par la voie que nous nous proposons d'utiliser.

a) *Pouvoir virulicide in vitro* : La proportion du produit à essayer est fonction de la quantité de virus à stériliser ; nous avons choisi arbitrairement les concentrations en virus fixe qui sont généralement adoptées pour le vaccin antirabique humain (5 p. 100 de matière cérébrale) ; le mélange du virus et du médicament est mis à l'étuve à 37° pendant des temps variables échelonnés d'un à cinq jours, puis inoculé par voie cérébrale à des lots de souris.

b) *Action in vivo* : Un lot de souris est inoculé par voie cérébrale avec des dilutions de virus fixe allant de 10^{-4} à 10^{-7} . Dès le lendemain de l'injection, puis chaque jour suivant, les souris reçoivent *per os* ou par voie intramusculaire le médicament en expérimentation. Pour chaque série, nous avons fait un « témoin du jour » inoculé en même temps et non traité ; la DL_{50} pour les témoins était approximativement $10^{-7,2}$.

c) *Action renforceuse sur la vaccination* : Nous avons pratiqué des tests de Habel classiques ; le produit chimique a été essayé soit en cours de vaccination, soit après l'inoculation intracérébrale des souris. Là encore des séries témoins furent faites chaque fois.

2^o RÉSULTATS. — Les 33 produits expérimentés nous ont donné des résultats très divers.

a) *Vitamines* : Nous avons recherché l'action possible de 5 vitamines (vitamines B₁, B₁₂, C, D, K) sur l'évolution de la rage expérimentale

de la souris. En dépit de doses généralement élevées, la DL_{50} fut similaire à celle des témoins qui ne recevaient aucun traitement.

b) *Anti-infectieux, anti-parasitaires, anti-inflammatoires* : Un certain nombre de produits anti-infectieux ou anti-parasitaires découverts récemment n'avaient encore jamais été expérimentés vis-à-vis du virus rabique fixe ; successivement, nous avons examiné l'isonicotinylhydrazine, la diaminodiphénylsulfone, la chloroquine, la carbamazine, l'émétine, la phénylbutazone et la Δ_1 -déhydrocortisone ; seule la phénylbutazone possède une action légère sur l'évolution de la rage expérimentale à virus fixe chez la souris.

c) *Mercuriothiolate sodique* : Le mercurothiolate n'a qu'une action faible sur le virus rabique, surtout si on le compare aux autres anti-rabiques tels que le formol ou le phénol. Son utilisation pour les vaccins antirabiques ne peut se justifier qu'à titre d'antiseptique microbien utile au cours de la fabrication du vaccin.

d) *Médicaments du système nerveux et antitoxiques* : Chez la souris qui fait une rage paralytique l'action du phénobarbital, de l'adrénaline ou de l'atropine est nulle. La strychnine a une influence favorable, mais de courte durée, à condition d'en répéter les injections plusieurs fois par jour. Le dithioglycérol n'agit que très faiblement. L'acide glutamique est sans action.

e) *Les dérivés arsenicaux* : Nous avons essayé dix composés arsenicaux différents, parmi lesquels l'arsénite de potassium, l'arséniate de sodium, le méthylarséniate de sodium, le stovarsol, l'orsanine, l'acétylarsan, la tryparsamide, l'arsobal, le sulfarsénobenzène et la diphétarsone. Parmi ceux-ci, seule la diphétarsone a présenté une certaine efficacité.

DIPHÉTARSONE (4763 RP). — Le pouvoir virulicide du 4763 RP à 1 p. 100 est difficile à apprécier par suite de sa toxicité.

Action in vitro. — *Souris* : après un jour d'incubation à 37° et huit jours au réfrigérateur à 4°, le virus fixe (5 p. 100 de matière cérébrale et 1 p. 100 de 4763 RP) tue encore de rage à virus fixe 100 p. 100 des souris inoculées par voie cérébrale. Il faut avoir un nombre suffisant d'animaux, car 25 p. 100 environ des animaux succombent immédiatement ou dans les premières vingt-quatre heures. Les mêmes résultats sont obtenus avec du virus fixe à 1 p. 100 et du 4763 RP à 1 p. 100.

Par voie péritonéale, 100 p. 100 des souris sont mortes dans les vingt-quatre heures, alors qu'administré seul, le 4763 RP ne donne qu'une mortalité d'environ 50 p. 100 à la dose utilisée.

Cobaye : mort en vingt-quatre heures après l'inoculation cérébrale.

Lapin : mort dans les mêmes délais.

La diphétarsone est donc moins virulicide que l'acide phénique utilisé dans les mêmes conditions.

Action in vivo. — *Per os* le 4763 RP se montra dépourvu de toute efficacité. Par voie intramusculaire [0,001 g/jour (50 mg/kg)] il eut une action considérable et ramena la DL_{50} de plus de 10^{-7} à 10^{-5} . L'action bienfaisante du 4763 RP s'est retrouvée sensiblement égale, lorsque le début des injections se situait le troisième jour après l'inoculation intracérébrale. En outre, il y a incontestablement un seuil

thérapeutique, car la diphétarsonne n'a produit aucun effet lorsque la dose intramusculaire n'était que de 25 mg/kg.

Action renforçatrice sur la vaccination antirabique. — Nous avons vacciné un lot de souris par voie intrapéritonéale avec du vaccin phéniqué dilué à 1/20 (0,25 cm³) tous les deux jours, selon la méthode de Habel. Quatre jours après la dernière injection intrapéritonéale, elles reçurent par voie cérébrale des dilutions différentes de virus fixe. Le traitement au 4763 RP fut commencé dans un cas le jour de l'inoculation intracérébrale et dans l'autre cas avec trois jours de retard.

Dans les deux cas, il y eut gain évident par rapport à la vaccination seule qui avait déjà ramené la DL₅₀ de 10⁻⁷ à 10⁻⁴.

ESSAIS DE VACCIN AU 4763 RP. — 1° *Virus fixe à 5 p. 100 de matière cérébrale + 4763 RP à 1 p. 1000.* — Nous référant aux expériences antérieurement citées, nous avons conservé le « vaccin » à 37° pendant quatre jours ; le test de Habel fut ensuite pratiqué. Le pouvoir protecteur a été très inférieur à celui du vaccin phéniqué ; sans doute, faut-il incriminer l'étuvage prolongé pour inactiver le virus ; c'est pourquoi nous avons refait l'expérience en adoptant une incubation à 37° de vingt-quatre heures seulement, mais en augmentant la concentration du 4763 RP.

2° *Virus fixe à 5 p. 100 de matière cérébrale + 1 p. 100 de 4763 RP.* — Même technique que pour l'épreuve précédente. Nous avons obtenu des résultats similaires à ceux obtenus à Saigon avec notre vaccin phéniqué à 0,5 p. 100.

Ce résultat est assez intéressant, car il pourrait être utile d'avoir un vaccin au moins aussi efficace que le vaccin phéniqué, tout en évitant une injection quotidienne supplémentaire de 4763 RP ; il n'est cependant pas certain que la dose de 4763 RP incluse dans le vaccin soit suffisante pour avoir un effet renforçateur incontestable.

f) *Les dérivés phénothiaziniques* (chlorpromazine, prométhazine, thiazinamium, diéthazine, isothazine) : la plupart de ces corps ont été déjà utilisés chez les malades en traitement antirabique, soit pour lutter contre des réactions allergiques locales, soit même dans un but thérapeutique chez des enrégés. Bien que très voisins chimiquement, il existe entre eux des différences d'action importantes ; le 2987 RP et le 3356 RP furent les seuls à présenter une certaine efficacité.

LA DIÉTHAZINE (2987 RP). — *Pouvoir virulicide in vitro.* — Si l'on se réfère à l'action du phénol qui, dans la préparation du vaccin phéniqué Fermi ou Simple, est à 1 p. 100 à 37° pendant au moins vingt-quatre heures, on constate que la diéthazine est environ quatre fois plus virulicide. La diéthazine à la concentration de 0,25 p. 100 est suffisante pour inactiver le virus fixe.

Pouvoir bactéricide. — Nguyen van Ai (Institut Pasteur de Saigon) a testé l'action antibactérienne. La diéthazine est non seulement bactériostatique, mais encore bactériolytique ; il n'y avait pas de croissance du staphylocoque Londres ni d'une variété de colibacille, jusqu'à la dilution de 0,005 g pour 100 ml (la diphétarsonne, même à 1 p. 100, n'avait montré aucun pouvoir inhibiteur).

Action in vivo. — La diéthazine, à la dose de 50 mg par kilo-

gramme, par jour et par voie intramusculaire, a permis d'abaisser d'une dilution la limite de la virulence du virus fixe pour la souris.

Action renforçatrice de la diéthazine sur la vaccination antirabique.

— La DL_{50} du test de Habel a été ramenée de 10^{-4} à 10^{-3} lorsque la diéthazine fut administrée aux souris. Il y a donc sûrement intérêt à associer la diéthazine à la vaccination antirabique, ou même à éprouver le pouvoir antigénique d'un « vaccin diparcolé » en vue de son utilisation chez l'homme.

L'ISOTHIAZINE. — Elle est un peu moins virulicide *in vitro* que la diéthazine, mais son action *in vivo* est similaire.

CONCLUSIONS. — Des essais de 33 produits chimiques nous ont montré dans le groupe des arsenicaux et des dérivés thiaziniques plusieurs corps éventuellement utilisables dans le traitement antirabique.

1° *La diphétarsone* : Le 4763 RP n'est actif que par voie intramusculaire et à partir d'un certain seuil. La dose létale 50 p. 100 du virus fixe a été ramenée chez les souris traitées de 1/10 000 000 à 1/100 000, ce qui dénote une action considérable si l'on pense que le traitement n'a été commencé qu'après l'inoculation intracérébrale. L'action conjuguée de la vaccination antirabique et du 4763 RP *par voie intramusculaire*, n'a pas été moins remarquable. La confection d'un vaccin à 5 p. 100 de matière cérébrale et 1 p. 100 de 4763 RP est possible, bien que son contrôle sur animal soit délicat ; l'efficacité sur souris d'un tel vaccin est comparable à celle du vaccin phéniqué à 0,5 p. 100. La diphétarsone possède une activité importante qui devrait la faire essayer conjointement à la vaccination chez l'homme, dans les cas de morsures graves de la face.

2° *La diéthazine et l'isothiazine* : Toutes deux sont douées d'un pouvoir virulicide important (quatre fois plus que le phénol pour la diéthazine). A partir d'un certain seuil thérapeutique, elles abaissent *in vivo* la virulence d'u virus rabique.

L'action renforçatrice de ces deux produits sur la vaccination antirabique n'est pas non plus négligeable. Nous poursuivons nos recherches à ce sujet.

**RECHERCHES CONCERNANT LA VIRULENCE
A L'ÉGARD DE L'EMBRYON DE POULET
DES SOUCHES PATHOGÈNES ET NON PATHOGÈNES
DE *BRUCELLA BRUCEI***

par D. BLITEK, J. PARNAS et S. ZUBER

(Chaire de Microbiologie de l'Académie de Médecine de Lublin)

L'embryon de poulet remplace actuellement dans certains cas les autres milieux. Les recherches suivantes ont eu pour objet de préciser la sensibilité des embryons de poulet à l'égard des brucelles. Trois souches ont été employées : la souche S 19, la souche BA et la souche 24.

MATÉRIEL ET MÉTHODE. — La souche S 19 est une variété *bovis*, obtenue en 1932 par Cotton et Buck au Etats-Unis. Depuis ce temps, la souche S 19 est considérée dans le monde entier comme la souche qui se prête le mieux à la production d'un vaccin vivant, avirulent, contre la brucellose des animaux.

Les nombreuses investigations effectuées dans différents pays, entre autres par A. Chodkowski et J. Parnas, en Pologne, ont démontré que la souche S 19 possède trois qualités :

- a) Elle est avirulente pour les cobayes ;
- b) Elle possède des qualités immunogènes ;
- c) Ces deux qualités sont stables.

La souche BA de Zdrodowski et Wierszilowa de Moscou nous a été remise par ces auteurs en 1955. En recherchant, parmi la collection soviétique des souches du pays, une brucelle qui se prêterait à la production d'un vaccin pour l'homme, Zdrodowski, Wierszilowa et coll. choisirent en 1950 une souche de la variété *bovis* nommée BA, qui, selon eux, possède pour l'homme les mêmes qualités que la souche S 19 pour les animaux.

Dans leurs études comparatives sur la souche BA et la souche S 19, J. Parnas et A. Chodkowski confirmèrent l'avirulence et les qualités immunogènes de la souche BA ; et ils notèrent une plus grande tendance à la dissociation de la souche de Zdrodowski.

La souche 24 est notre souche standard ; sa grande virulence a été établie par la méthode bactériologique et par la méthode histo-pathologique (A. Zozicka et J. Parnas, 1955).

Les souches sus-mentionnées étaient ensemencées légèrement sur le milieu de Braun, après quoi, à l'aide de la méthode modifiée de Henry et des méthodes de Braun et de Burnet, on définissait le degré de dissociation ; on employait alors exclusivement les colonies de forme S. Au moyen de suspensions ainsi préparées, on infectait des embryons d'œufs vivants, ayant respectivement 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 9 jours. L'infection était

effectuée dans le jaune d'œuf, par l'introduction de 0,1 ml de suspension contenant 10, 100, 1 000 et 10 000 brucelles au millilitre.

De cette manière, on infecta :

Avec la souche S 19	350 embryons
Avec la souche BA	336 embryons
Avec la souche 24	364 embryons

Après l'infection on plaçait les œufs dans un incubateur à la température de 36° C, en contrôlant chaque jour la vitalité des embryons.

Les embryons qui ne montraient plus de signes de vie étaient ouverts ; on examinait les changements anatomo-pathologiques et préparait le matériel pour les ensemencements du jaune d'œuf, du liquide amniotique et, pour les embryons qui avaient 6 à 9 jours, du foie. Le matériel était ensemencé légèrement sur des plaques de Braun pour permettre de préciser le degré de dissociation de la culture.

RÉSULTATS. — En ce qui concerne la souche S 19, les expériences démontrèrent la relation entre l'âge de l'embryon, la dose infectante et la rapidité du dépérissement. On remarqua aussi la relation entre l'âge de l'embryon, l'intensité des changements anatomo-pathologiques et la dose infectante. On constata que les embryons ayant 3 à 4 jours mouraient du troisième au cinquième jour après l'infection, les embryons ayant 5, 6 ou 7 jours mouraient entre le troisième et le septième jour, les embryons ayant 8 et 9 jours à partir du quatrième jour et quelques-uns, infectés avec une dose de 10 brucelles, restaient vivants pendant neuf jours.

Des constatations semblables furent faites avec la souche BA. Les embryons de 3 et 4 jours mouraient de trois à six jours après l'infection ; les embryons âgés de 8 jours du troisième au septième jour ; les embryons âgés de 9 jours ne furent pas examinés.

Avec la souche 24, les embryons ayant 3 et 4 jours mouraient du deuxième au quatrième jour après l'infection, tandis que ceux qui avaient 5, 6 ou 7 jours mouraient du troisième au cinquième jour et les embryons ayant 8 à 9 jours, de trois à six jours après l'infection. Les altérations anatomo-pathologiques étaient les suivantes :

1° Chorion trouble, fortement hyperémique, avec infiltrations sanguines.

2° Liquide amniotique coloré par le sang ; congestion des organes. Lorsque le liquide amniotique était intensément coloré par le sang, les embryons étaient d'une pâleur livide (infection effectuée avec 1 000 et 100 brucelles au millilitre). Lorsque le liquide était faiblement coloré, les organes et les muscles présentaient une forte hyperémie (100 et 10 brucelles au millilitre). Ces modifications ne furent pas observées dans les embryons témoins.

3° Organes internes hypertrophiés, parfois fortement sanguinolants.

4° Relation entre le volume des embryons et la dose d'infection : plus la dose était forte, moins développé était l'embryon et plus rapidement il mourait. Ces changements se manifestaient chez les embryons inoculés avec les souches S 19, BA et 24 ; ils étaient plus marqués chez les embryons infectés avec la souche 24.

La souche 24 se montra très virulente pour les embryons de poulet, mais les souches BA et S 19 étaient, elles aussi, virulentes. La virulence

des brucelles, définie d'après la survie des embryons après l'infection, se présentait de la manière suivante :

Parmi 300 embryons infectés avec la souche S 19 aux doses de 1 000, 100 et 10 brucelles, il y avait le premier et le deuxième jour 100 p. 100 de survivants, 92 p. 100 le troisième jour, 68,7 p. 100 le quatrième jour, 27,4 p. 100 le cinquième jour, 9,8 p. 100 le sixième jour, 4,8 p. 100 le septième jour, 4,2 p. 100 le huitième jour, 4,0 p. 100 le neuvième jour.

Parmi les 288 embryons infectés avec la souche BA aux doses de 1 000, 100 et 10 brucelles, il y avait 100 p. 100 de survivants le premier et le deuxième jour, 91,7 p. 100 le troisième jour, 63,2 p. 100 le quatrième jour, 21,2 p. 100 le cinquième jour, 7,0 p. 100 le sixième jour, 0 p. 100 le septième jour.

Parmi les 312 embryons infectés avec la souche 24 aux doses de 1 000, 100 et 10 brucelles, il y avait 100 p. 100 de survivants le premier jour, 93,3 p. 100 le deuxième jour, 61,6 p. 100 le troisième jour, 31,2 p. 100 le quatrième jour, 5,6 p. 100 le cinquième jour, 0,8 p. 100 le sixième jour, 0 p. 100 le septième jour.

Ces résultats démontrent la plus grande virulence de la souche 24.

Brucella brucei, cultivée sur l'embryon de poulet, a une tendance marquée à la dissociation, qui se traduit par la présence, à côté des colonies de type S, de nombreuses colonies R et de colonies intermédiaires I. La dissociation n'est pas égale chez les trois souches de brucelle considérées :

a) Souche S 19	20 p. 100 de types R et intermédiaires I
b) Souche BA	30 p. 100 de types R et intermédiaires I
c) Souche 24	Type S pur

CONCLUSION. — Les expériences rapportées, portant sur un total de 986 embryons (sans compter les embryons témoins et les embryons morts), montrent que ces embryons sont d'une très grande sensibilité vis-à-vis des souches de *Br. brucei* virulentes ou avirulentes pour le cobaye. Elles montrent également que ces embryons sont sensibles à des doses voisines de 10 brucelles. Cette sensibilité ne se rencontre dans aucune autre espèce. On peut donc considérer l'œuf embryonné comme le meilleur milieu pour les ensemencements de sang, en matière de brucellose, ce qui confirme les conclusions de Carrère et Roux, et d'autres auteurs.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Electrophorèse du venin d'*Ancistrodon rhodostoma* boie, par
H. PLAGNOL et P. MARTIN.

Les bactériophages typhiques dans les eaux d'Hanoi, par
H. LECLERC.

Propriétés générales des cultures d'Entérobactériacées rendues colicinogènes par transfert, par Y. HAMON.

La sérologie des bactériocines et ses applications, par Y. HAMON.

Multiplication du virus poliomyélitique dans les cultures *in vitro* des cellules exsudatives du singe sans effet cytopathogène généralisé, par G. BARSKI et M^{me} F. ROBBE-FOSSAT.

Résistance du système nerveux vis-à-vis de l'infection tuberculeuse mise en évidence au moyen d'une méthode histobactériologique originale, par G. STROESCO.

AVIS

Le Congrès National des Sciences Médicales, qui devait avoir lieu à Bucarest le 25 novembre 1956, est remis au mois d'avril 1957.

Pour tous renseignements, s'adresser au Comité d'Organisation du Congrès, Bucarest, 125 Calea Victoriei.

LIVRES REÇUS

M. F. Jayle et G. Schapira. — *Précis de chimie physiologique et sémiologie*. 1 vol., 292 p., 75 fig., Masson, édit., Paris, 1956. Prix : 1 600 fr.

Cet ouvrage constitue la nouvelle édition du *Précis de biochimie clinique* du professeur Jayle, mais les importantes modifications qu'il a reçues en font un livre nouveau, conçu avant tout dans un esprit pratique. Sous la dénomination de « sémiologie », les auteurs entendent les symptômes qui résultent de la mise en évidence, dans un liquide biologique, d'une substance inhabituelle ou d'une concentration anormale d'un constituant régulier. C'est dire que l'ouvrage apporte une vue générale des principaux problèmes de biochimie humaine. Il s'adresse non seulement aux étudiants en médecine, mais aux médecins praticiens et insiste plus particulièrement sur les méthodes d'exploration fonctionnelle du milieu intérieur et des organes. Il comprend 13 chapitres concernant la coagulation du sang, les éléments figurés et les protéines du sang, la glycémie et le diabète, la biochimie du rein et de l'urine, l'exploration biochimique du tube digestif, la biochimie physiologique et pathologique des muscles, des glandes endocrines, la composition du L. C.-R., etc. Il est complété par un index alphabétique très détaillé.

H. T.

Lectures on the scientific basis of medicine, vol. IV. 1 vol., 386 p., The Athlone Press, édit., Londres, 1956. Prix : 37 s. 6 d.

Comme les années précédentes, ce volume contient quelques-unes des conférences qui ont été prononcées à la British Postgraduate Medical Federation en 1954-1955, et qui sont destinées aux jeunes chercheurs et aux futurs médecins. Elles ont pour but de les mettre au courant des dernières acquisitions dans divers domaines. Le présent volume étudie la structure moléculaire de différentes protéines (cyto-protéines, nucléo-protéines, protéines du plasma), les bases chimiques de la spécificité des groupes sanguins, la nouvelle orientation des recherches sur les virus, diverses questions concernant les enzymes et les hormones ; il contient enfin un chapitre sur les « aspects chimiques de la croissance anormale » particulièrement intéressant par le rapprochement qu'il permet entre le développement anormal et les découvertes récentes sur le pouvoir transformateur des acides nucléiques.

H. T.

J. Sinkovics. — *Die Grundlagen der Virusforschung.* 1 vol., 420 p., 150 fig., 39 tableaux. Verlag der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Budapest, 1955.

Ce volume est la traduction de l'original hongrois, paru en 1954, et constitue une étude générale des virus, mettant spécialement l'accent sur les travaux hongrois. Il est divisé en deux parties : une partie générale et une partie pratique. La première, outre les questions théoriques (origine des virus, etc.), envisage les propriétés physiques, chimiques, biologiques, immunologiques des virus et des bactériophages et propose une classification des virus. La seconde passe en revue les techniques de laboratoire : isolement, purification, culture, inoculation, titrage, conservation des virus. Les très nombreuses figures, toutes sur papier couché comme le volume entier, montrent l'aspect des virus au microscope électronique, les lésions histologiques qu'ils provoquent, etc.

L'ouvrage comporte 1 488 références bibliographiques et un index alphabétique extrêmement détaillé et très soigneusement rédigé.

H. T.

A. Lacassagne et G. Gricouloff. — *Action des radiations ionisantes sur l'organisme.* 1 vol., 198 p., 17 fig., Masson, édit., Paris, 1955. Prix : 1 500 fr.

De même que la première édition de cet ouvrage, qui avait paru en 1941, le présent volume s'adresse avant tout aux jeunes médecins futurs radiologues. Il présente l'ensemble des faits actuellement connus sur l'action du radium et des rayons X sur les tissus et les organes, mais il tient compte des importants progrès réalisés dans ce domaine depuis 1941, en particulier en ce qui concerne la radio-activité artificielle, l'action génétique des radiations, les altérations provoquées chez l'embryon, etc.

L'ouvrage commence par un chapitre de généralités sur le mode d'action des radiations, dont il étudie ensuite l'effet sur les différents

tissus, organes, systèmes glandulaires de l'organisme. Le dernier chapitre est plus particulièrement consacré à l'emploi de ces radiations dans les processus cancéreux et à leur application en thérapeutique humaine.

H. T.

Trente exposés sur des sujets actuels d'endocrinologie, publiés sous la direction de J. DECOURT et GILBERT-DREYFUS. 1 vol., 394 p., Masson, édit., Paris, 1956. Prix : 2 800 fr.

Il s'agit des leçons faites au cours d'endocrinologie de l'Hôpital de la Pitié. OEuvre des spécialistes les plus compétents, l'ouvrage constitue une mise au point de l'état actuel de nos connaissances sur les divers sujets traités, le plus grand nombre des exposés étant consacré aux glandes thyroïdes et surrénales et à leur pathologie.

H. T.

E. G. Nauck et coll. — *Lehrbuch der Tropenkrankheiten*. 1 vol., VIII + 432 p., 125 fig., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1956. Prix : 64 DM.

Depuis la parution en 1942 du livre de Ruge-Mühlens il n'existait, en langue allemande, aucun ouvrage sur les maladies tropicales ; le présent volume est destiné à présenter les connaissances acquises depuis lors. Il est l'œuvre du professeur Nauck, directeur du célèbre Institut pour l'étude des maladies tropicales de Hambourg, et de ses collaborateurs. Il s'adresse non seulement aux étudiants de cet Institut, mais aussi à tous les médecins et chercheurs se destinant à travailler sous les tropiques. Il étudie successivement les maladies tropicales causées par les arthropodes, les vers, les protozoaires, les spirochètes, les bactéries, les virus, les champignons, celles qui sont consécutives à des carences ou à des intoxications, etc. Le volume est magnifiquement présenté sur papier couché, comprend un très grand nombre de belles photographies, dont plusieurs en couleurs, et un index alphabétique de 20 pages, qui en facilite considérablement l'usage.

H. T.

Ciba Foundation Symposium on paper electrophoresis. 1 vol., 224 p., 74 fig., J. et A. Churchill, édit., Londres, 1956. Prix : 35 shillings.

Ce Symposium avait surtout pour but, en réunissant des chercheurs de différents pays, d'étudier les raisons des variations souvent observées entre les résultats des divers laboratoires travaillant avec cette méthode, encore relativement nouvelle. Ces divergences sont dues, le plus souvent, aux techniques et aux matériels différents employés. Les communications présentées dans le volume étudient l'application de l'électrophorèse sur papier à diverses maladies, à la recherche des constituants du sérum, etc., et discutent les divers facteurs qui peuvent influencer sur les résultats. Cette technique a certainement devant elle un grand avenir.

H. T.

Ciba Foundation Symposium on bone structure and metabolism. 1 vol., 229 p., 122 fig., J. et A. Churchill, édit., Londres, 1956. Prix : 45 shillings.

Les diverses notes de ce Symposium, partant de la structure et du métabolisme de l'os, passent ensuite à son étude biochimique, puis physiologique, pour aboutir aux considérations cliniques. Elles insistent sur les techniques modernes qui ont révélé certains aspects nouveaux de la structure et de la constitution de l'os, sur le métabolisme des divers minéraux, le rôle des vitamines et de la glande parathyroïde. Le volume est illustré de plusieurs figures en hors texte et comprend les discussions de chacune des communications.

H. T.

K. C. Smithburn et coll. — *La vaccination anti-marielle.* O. M. S., Série de Monographies, n° 30, 1956. 243 p., 37 fig. Prix : Fr. s., 12,- ; £ 1 ; \$ 4.

Depuis les premières vaccinations contre la fièvre jaune, pratiquées en A. O. F. en 1934, des dizaines de millions de personnes ont été immunisées et la fièvre jaune est devenue une maladie rare. Elle a pratiquement disparu de l'A. O. F. et de l'A. E. F., où l'on emploie le vaccin de l'Institut Pasteur de Dakar (souche ayant perdu son pouvoir pathogène pour le singe par passages répétés sur cerveau de souris). Dans le reste du monde, on emploie le vaccin 17D (cultivé sur embryon de poulet). L'ouvrage expose les détails de la préparation de ces vaccins, les techniques de vaccination et l'immunité obtenue. Il commence par une étude générale sur l'immunologie de la fièvre jaune et se termine par un chapitre sur la réglementation internationale de la vaccination anti-marielle. Ont collaboré à sa rédaction : MM. Durieux, Koerber, Penna, Dick, Courtois, de Souza Manso, Stuart et Bonnel.

H. T.

Foreami (*Fonds Reine Elisabeth pour l'Assistance Médicale aux Indigènes du Congo Belge*). *Rapport sur l'activité durant l'année 1955.* 1 vol., 138 p., Foreami, édit., 14, square de Meeus, Bruxelles, Belgique.

Le Gérant : G. MASSON.